

**Aus der Klinik für Gynäkologie, gynäkologische Endokrinologie und
Onkologie**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. U. Wagner
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchung des Einflusses von CA125 auf
Chemoresistenz, Sphäroidbildung und
Tumorstammzellmarkerexpression in
Ovarialkarzinomzellen**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin**

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Eva Kull

aus Heidelberg

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 05.05.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. U. Wagner

1. Korreferent: Frau PD Dr. C. Brendel

Meiner Familie

1. Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit	1
1.2 Das Epitheliale Ovarialkarzinom	2
1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie	2
1.2.2 Stadieneinteilung und Klassifikation	3
1.2.3 Klinik, Diagnostik und Früherkennung	5
1.2.4 Therapie des Ovarialkarzinoms	7
1.3 Sphäroide	12
1.4 Das Tumorassoziierte Antigen CA125	14
1.4.1 Anwendung von CA125 in der Klinik	15
1.4.2 Der molekulare Aufbau von CA125	18
1.4.3. Die Funktion von CA125	19
1.5 Tumorstammzellen	21
1.5.1 Das Tumorstammzellmodell	21
1.5.2 Eigenschaften von Tumorstammzellen	23
1.5.3 Tumorstammzellmarker	24
2 Material	28
2.1 Verwendete Materialien	28
2.1.1 Chemikalien, Puffer und sonstige Reagenzien	28
2.1.2 Kits	29
2.1.3 Antikörper, Marker	30
2.1.4 Bakterien, Zelllinien	30
2.1.5 Primer und Plasmide	30
2.1.6 Verbrauchsmaterial	31
2.2 Verwendete Geräte und Software	31
2.3 Zellkulturmedien und Pufferzusammensetzungen	32
3 Methoden	33
3.1 Zellkultur	33
3.1.1 Zelllinie	33
3.1.2 Passagieren und Aussäen von Zellen	34
3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
3.1.4 Chemotherapeutikabehandlung und Proliferationsbestimmung mit Hilfe von MTT	37
3.1.5 Sphäroidkultur und Chemotherapeutikabehandlung	39
3.2 Durchflusszytometrische Analysen	40
3.2.1 Aldefluor	40
3.2.2 Nachweis von CA125 auf der Zelloberfläche	42
3.2.3 Anfärbung von verschiedenen Tumorstammzellmarker auf der Zelloberfläche	43
3.3 Statistische Auswertung	44
4 Ergebnisse	46
4.1 Quantifizierung des CA125 Knockdowns auf mRNA- und Proteinebene	46
4.1.1 Kontrolle des CA125 Knockdowns auf mRNA Ebene	46
4.1.2 Nachweis der CA125 Oberflächenexpression	46
4.2 Expression von Tumorstammzellmarkern	48
4.2.1 Tumormarker CD24, CD44, CD133 und CD117 in der Zelllinie OAWB8 ⁻	48
4.2.2 Tumormarker CD24, CD44 und CD133 in der Zelllinie OAWH8 ⁺	49
4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse beider Zelllinien	50
4.2.4 Messung der Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität in der Zelllinie OAWB8 ⁻	51
4.2.5 Messung der Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität in der Zelllinie OAWH8 ⁺	52
4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse beider Zelllinien	52

4.3 Einfluss von CA125 auf die Chemosensitivität von Ovarialkarzinomzellen.....	53
4.3.1 Chemosensitivität in der Zelllinie OAWB8 ⁻	54
4.3.2 Chemosensitivität in der Zelllinie OAWH8 ⁺	57
4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse beider Zelllinien	59
4.4 Sphäroidbildung	61
4.4.1 Sphäroidbildung der Zelllinie OAWB8 ⁻ auf der Suspensionsplatte	62
4.4.2 Sphäroidbildung der Zelllinie OAWB8 ⁻ auf der Low-Attachment-Platte.....	64
4.4.3 Sphäroidbildung der Zellreihe OAWH8 ⁺	66
4.5 Einfluss von CA125 auf die Chemosensitivität von Ovarialkarzinomzellen nach Sphäroidkultur	67
4.5.1 Chemosensitivität der Zelllinie OAWB8 ⁻ in Sphäroidkultur	68
4.5.2 Chemosensitivität der Zelllinie OAWH8 ⁺ in Sphäroidkultur	70
4.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse beider Zelllinien	72
4.6 Vergleich der NC-Zellen und der CA125⁻ Klone der Zelllinie OAWH8⁺ in Sphäroidkultur	74
5 Diskussion	76
5.1 Das gewählte CA125 Knockdownmodell	76
5.2 Expression von Tumorstammzellmarkern auf der Zelloberfläche	76
5.2.1 ALDH	77
5.2.2 CD24 und CD44.....	78
5.2.3 CD133 und CD117	79
5.2.4 Fazit der Tumorstammzellmarker	80
5.3 Chemosensitivitätsbestimmung nach Monolayerkultur.....	82
5.3.1 Die Wahl der Chemoreagenzien	82
5.3.2 CA125 und die Chemoresistenz.....	83
5.3.3 Das divergente Verhalten von OAWH8 ⁺ und OAWB8 ⁻	85
5.3.4 Die Kombinationstherapie und der Synergismuseffekt.....	86
5.4 Sphäroide	87
5.4.1 Sphäroidbildung.....	88
5.4.2 Chemosensitivitätsbestimmung nach Sphäroidkultur	88
5.5 Ausblick	90
6 Zusammenfassung	92
6.1 Der Einfluss von CA125 auf Chemoresistenz, Sphäroidbildung und Tumorstammzellmarkerexpression in Ovarialkarzinomzellen	92
6.2 The influence of CA125 on chemosensitivity, sphere formation and cancer stem cell markers in ovarian cancer cells.....	93
7 Literaturverzeichnis	95
8 Anhang	111
8.1 Abbildungsverzeichnis	111
8.2 Tabellenverzeichnis	113
8.3 Abkürzungsverzeichnis.....	114
8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer	116
8.6 Danksagung	117

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit

Mit rund 8000 Neuerkrankungen pro Jahr gehört das Ovarialkarzinom in Deutschland zu den 10 häufigsten Krebserkrankungen unter den Frauen und macht dabei 5,6 % aller Krebssterbefälle aus (Siegel, Naishadham, & Jemal, 2013). Damit handelt es sich bei dem Ovarialkarzinom um das Genitalmalignom mit der höchsten Mortalität.

Die Symptomarmut zu Beginn der Erkrankung bedingt dabei unter anderem eine späte Diagnosestellung und somit eine schlechtere Prognose im Vergleich zu Patientinnen mit anderen Karzinomen des Geschlechtsorgans.

Es ist daher von großem Interesse, molekularebiologische Zusammenhänge, die für die Entstehung des Ovarialkarzinoms von Bedeutung sind, zu verstehen, um neue Diagnostik- und Therapieoptionen entwickeln zu können. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem Tumor-assoziierten Antigen CA125, dessen Überproduktion ein wichtiges molekularebiologisches Charakteristikum des Ovarialkarzinoms darstellt. Derzeit findet die Messung erhöhter CA125 Werte im Serum bei Ovarialkarzinompatientinnen klinisch vor allem zur Differentialdiagnostik und Verlaufskontrolle Anwendung.

Die Entwicklung von peritonealen Metastasen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist zum größten Teil auf die Fähigkeit von gestreuten Tumorzellen zurückzuführen, die zur Bildung von Tumorzellaggregaten, sogenannten Sphäroiden, fähig sind, die frei im malignen Aszites schwimmen. Diese können später die Oberfläche des Peritoneums befallen und Metastasen bilden. Des Weiteren stehen diese Zellen vermutlich mit der hohen Rezidivrate in Verbindung. Dabei scheint die aktuelle Tumorbehandlung mit Chemotherapie besonders bei fortgeschrittenen Karzinomen oft keinen oder zumindest nicht den gewünschten Erfolg zu zeigen. Die Fähigkeit zur Sphäroidbildung sowie die Bildung einer Chemoresistenz gehören zu den essentiellen Charakteristika von Tumorstammzelle.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CA125 auf die Expression von Tumorstammzellmarkern, die Chemoresistenz sowie die Sphäroidbildung von Ovarialkarzinomzellen untersucht. Dabei wurden short hairpin RNA (shRNA)-transiente und stabile CA125 Knockdown Klone einer Ovarialkarzinomzelllinie verwendet. Durch den Vergleich der Knockdown Klone mit ihrer CA125-positiven (CA125⁺) Kontrolle konnte die Bedeutung von CA125 im Ovarialkarzinom analysiert werden.

1.2 Das Epitheliale Ovarialkarzinom

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Wahrscheinlichkeit einer Frau in Deutschland innerhalb ihres Lebens an einem bösartigen Tumor des Ovars zu erkranken liegt laut dem Robert Koch-Institut bei 1,5 %. Dabei sind 3,5 % aller bösartigen Neubildungen bei Frauen in Deutschland Ovarialkarzinome. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren, wobei die Erkrankungsraten bis zum 85. Lebensjahr kontinuierlich ansteigen (Kaatsch, Spix, & Hentschel, 2013).

Da bei Tumoren im Ovar zumeist die typischen Frühsymptome fehlen, wird die Erkrankung in den meisten Fällen erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt. Außerdem ist eine Diagnosestellung in einem frühen Stadium aufgrund der anatomisch schwer zugänglichen Lage eher selten und zumeist ein Zufallsbefund. Bedingt durch unter anderem eine späte Diagnosestellung ist die Prognose für Patientinnen mit Ovarialkarzinomen im Vergleich zu Patientinnen mit anderen Karzinomen des Geschlechtsorgans ungünstig (Brewer, Johnson, Follen, Gershenson, & Bast, 2003).

Die Erkrankungsrate des Ovarialkarzinoms hält sich in den letzten Jahren weitestgehend konstant, wohingegen die Mortalitätsrate merklich abnimmt. Diese liegt derzeit bei 8,9 % (Kaatsch et al., 2013) und ist damit immer noch wesentlich höher als die der anderen gynäkologischen Tumorerkrankungen. Das relative 5-Jahres-Überleben liegt derzeit bei nur 42 %. Dabei zeigen Frauen im Stadium I und II eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90 % und 70 %, wohingegen Frauen im Stadium III und IV nur noch mit einem 5-Jahres-Überleben von 30 % und schlechter rechnen können (Brewer et al., 2003).

Weltweit betrachtet sind die Inzidenzen in europäischen Ländern mehr als doppelt so hoch wie in afrikanischen und asiatischen Staaten (Kaatsch et al., 2013).

Es existieren verschiedene Hypothesen darüber, aus welchem Ursprungsgewebe die Zellen des Ovarialkarzinoms stammen. Das Ovar setzt sich aus einer Vielfalt von Geweben zusammen, wobei sich die meisten malignen Neoplasien im Oberflächenepithel bilden, welches das Ovar sowie auch die Tuben bedeckt. Dabei zeigen die Studien der letzten Jahre, dass der wichtigste Risikofaktor für das Ovarialkarzinom die familiäre Häufung von Karzinomen und damit assoziierte genetische Syndrome sind.

1.2.2 Stadieneinteilung und Klassifikation

Das Ovarialkarzinom wird je nach Ausbreitung gemäß den 1997 von der internationalen Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe (International Federation of Gynecology and Obstetrics) erstellten, sogenannten FIGO-Stadien eingeteilt. Des Weiteren lassen sich Ovarialkarzinome nach der TNM-Klassifikation einteilen. Die nachfolgende Tabelle zeigt TNM- und FIGO-Stadien mit der jeweiligen Befundsituation.

TNM	Befundssituation	FIGO
T1	begrenzt auf Ovarien	I
T1a	begrenzt auf ein Ovar, Kapsel intakt, Peritoneallavage negativ	IA
T1b	begrenzt auf beide Ovarien, Kapseln intakt, Peritoneallavage negativ	IB
T1c	Tumor auf ein oder beide Ovarien beschränkt	IC
	iatrogene Kapselruptur	IC1
	präoperative Kapselruptur oder Tumor auf Ovarienoberfläche	IC2
	Aszites/Lavage mit malignen Zellen	IC3
T2	Ausbreitung im Becken	II
T2a	Ausbreitung auf Uterus, Tube(n)	IIA
T2b	Ausbreitung auf andere Beckenorgane	IIB
T3	retroperitoneale LK-Metastasen und/oder Mikrometastasen außerhalb des kleinen Beckens	III
T3a	positive retroperitoneale Lk u/o mikroskopische extrapelvine Metastasen	IIIA (nur N0)
	ausschließlich positive retroperitoneale Lk	IIIA1
	Metastasen ≤ 10 mm	IIIA1(i)
	Metastasen > 10 mm	IIIA1(ii)
	mikroskopische extrapelvine, peritoneale Beteiligung mit/ohne retroperitoneale Lk-Metastasen	IIIA2
T3b	Peritoneal-Met. < 2 cm mit/ohne retroperitoneale Lk-Metastasen, inkl. Ausbreitung auf Leber-/Milzkapsel	IIIB (nur N0)
T3c	Peritoneal-Met. ≥ 2 cm mit/ohne retroperitoneale Lk-Metastasen inkl. Ausbreitung auf Leber-/Milzkapsel	IIIC
N1	reg. Lk-Met. (> 10 Lk untersucht)	IIIC
M1	Fernmetastasen	IV
	Pleuraerguss mit positiver Zytologie	IVa
	Parenchymale Metastasen in Leber/Milz, außerhalb des Abdomens gelegene Organe.	IVb

Tabelle 1: FIGO-Stadien und TNM-Klassifikation des Ovarialkarzinoms nach J. Prat (Prat, 2014).

Das Tumorwachstum beschränkt sich im Stadium I auf die Ovarien und im Stadium II auf das Becken. Stadium III und IV zählen zu den fortgeschrittenen Stadien, da sich der Tumor über das kleine Becken hinaus in den abdominalen Bereich ausgebreitet hat oder zumindest regionale Lymphknoten befallen sind.

Dabei stellen maligne epitheliale Karzinome die am häufigsten vorkommenden Tumore des Ovars dar. Sie werden histopathologisch und molekulargenetisch in 5 verschiedene Hauptgruppen eingeteilt, die untereinander sehr heterogen sind. Dabei stellt das seröse Karzinom die häufigste Form der Ovarialkarzinome dar (60%). Des Weiteren unterscheidet man endometrioiden Tumoren (10-20%), klarzellige Tumoren (10%), muzinöse Tumoren (5%) sowie gemischt epitheliale Tumoren (6%) (Lalwani et al., 2011; Seidman et al., 2004).

Außerdem findet man in der Literatur eine weitere Einteilung in der Ovarialkarzinome jeweils in Low-Grade (Typ I) und High-Grade (Typ II) Tumore

eingeteilt werden. Zum Typ I werden gut differenzierte seröse, muzinöse und endometrioide Karzinome gezählt. Sie entwickeln sich aus genetisch stabilen Vorläuferläsionen von meist Borderline Tumoren und werden aufgrund ihrer geringeren Aggressivität meist in einem frühen Stadium diagnostiziert (Kurman & Shih, 2011). Zu den Typ II Tumoren hingegen werden wenig differenzierte seröse, endometrioide oder gemischt epitheliale Tumore gezählt. Sie entstehen de novo aus dem ovariellen Epithel, wachsen aggressiver und werden meist in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Kurman & Shih, 2010, 2011; Lalwani et al., 2011).

1.2.3 Klinik, Diagnostik und Früherkennung

Das Ovarialkarzinom ist das Genitalmalignom mit der höchsten Mortalität. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass bei Tumoren im Ovar zumeist die typischen Frühsymptome fehlen und die Erkrankung somit erst in einem fortgeschrittenen Stadium festgestellt wird. Das Konzept hinter einem potentiellen Screening-Programm für Ovarialkarzinome wäre daher die Diagnosestellung in einem frühen Stadium des Tumors und somit die Aussicht auf ein besseres Überleben der Patientinnen (Partridge et al., 2009). Trotz weitreichenden Bemühungen ist es jedoch bis heute nicht gelungen ein geeignetes Screeningverfahren zu ermitteln, das dieses Ziel zuverlässig erreicht.

Es konnte gezeigt werden, dass 89 % der Patientinnen bei Nachweis eines Ovarialkarzinoms Symptome in einem frühen Stadium aufgewiesen haben. Goff und Kollegen ermittelten daraufhin einen Symptomindex zu dem die folgenden 6 Symptome zählen: abdominelle oder pelvine Schmerzen, Zunahme des Bauchumfangs, Blähungen, Schwierigkeiten beim Essen und ein frühes Sättigungsgefühl über mehr als 12 Tage pro Monat. Diese Symptome galten in ihrer Studie als Index mit dessen Hilfe die frühzeitige Diagnostik verbessert werden sollte. Dabei zeigte der Index eine Sensitivität für die Erkennung von frühen Tumorstadien von 56,7 % und von 79,5 % für fortgeschrittene Tumorstadien (Goff et al., 2007). Andersen und Kollegen optimierten diese Methode indem sie zusätzlich zum Symptomindex die Messung des Serum-Biomarkers CA125 miteinbezogen. Mit dieser Methode konnten sie die Sensitivität nochmals

verbessern und identifizierten > 80 % der Frauen in einem frühen Stadium (Andersen et al., 2008).

Patientinnen mit unklaren Beschwerden im Unterleib sollten daher immer gynäkologisch untersucht werden. Allein die bimanuelle rektovaginale Palpation kann Aufschluss über Beweglichkeit, Konsistenz, Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Adnexe geben. Auch der Body-Mass-Index könnte eine Rolle zur Früherkennung von Ovarialtumoren spielen. Dixon und Kollegen konnten in ihrer Arbeit einen Zusammenhang von hohem Body-Mass-Index (BMI) mit dem Auftreten von Low-grade Ovarialtumoren aufzeigen (Dixon et al., 2016).

Des Weiteren gilt der transvaginale Ultraschall als ein wichtiger Bestandteil eines möglichen Screenings für Ovarialkarzinome. Mithilfe dieser Methode können Abnormitäten in Größe und Volumen des Ovars gut ermittelt werden. Im Ultraschall kann jedoch nicht eindeutig zwischen benigner oder maligner Dignität eines Tumors unterschieden werden. Transvaginale Sonographie allein hat somit eine hohe Sensitivität gleichzeitig jedoch einen niedrigen positiv prädiktiven Wert (Pavlik & van Nagell, 2013; Suh-Burgmann & Kinney, 2016).

Im Rahmen der Verlaufskontrolle sowie der Nachsorge bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom erfolgt die Bestimmung des serologischen Biomarkers CA125, auf den in einem separaten Kapitel noch genauer eingegangen wird. Bei ca. 80 % der Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist dieser Marker erhöht. Aufgrund seiner geringen Spezifität sollte dieser Wert allerdings nur in Kombination mit weiteren diagnostischen Maßnahmen, wie u.a. dem transvaginalen Ultraschall beurteilt werden (Sturgeon, Duffy, & Walker, 2011).

Zur differenzialdiagnostischen Abklärung können zusätzlich Computertomographie und Kernspintomographie als bildgebende Diagnostik durchgeführt werden (Kinkel, Lu, Mehdizade, Pelte, & Hricak, 2005). Zur präoperativen Vorbereitung sowie zur Erfassung des Ausmaßes eines möglichen Pleuraergusses erfolgt vor einer Operation ein Röntgenthorax. Eine Kolposkopie, eine Zystoskopie und ein Ausscheidungsurogramm werden bei Verdacht auf Darm-, Ureter- oder Harnblasenbeteiligung veranlasst.

Letztendlich werden Serum-Biomarker, transvaginaler Ultraschall und weitere diagnostische Verfahren in der Klinik zusammen für die Identifizierung von

malignen Ovarialkarzinomen angewandt. Dies soll eine präoperative Selektion der Hochrisikofälle ermöglichen, um unnötige Operationen bei falsch positiven Ergebnissen zu vermeiden. Die Kombination der Diagnostikverfahren ist letztlich mit einer früheren Detektion von Ovarialkarzinomen assoziiert (Pavlik & van Nagell, 2013). Nichtsdestotrotz konnte dadurch bisher weder für die Normalpopulation noch für die Hochrisikogruppen eine Mortalitätsreduktion erreicht werden (Buys et al., 2011; Hogg & Friedlander, 2004; Stirling, Porteous, Evans, Pichert, & Steel, 2006). Aus diesem Grund wird ein routinemäßiges Screening auf Ovarialkarzinome derzeit noch von keiner nationalen Gesundheitsorganisation empfohlen.

1.2.4 Therapie des Ovarialkarzinoms

Operative Therapie

Die operative Therapie spielt eine wesentliche Rolle für ein optimales Behandlungsmanagement bei Ovarialkarzinomen in sämtlichen Stadien. Dank einem akkuraten Tumorstaging, einer optimalen Tumorresektion und anschließender Chemotherapie konnte in den letzten 3 Dekaden eine Verbesserung des 5-Jahres-Überleben der Patientinnen verzeichnet werden (Fader & Rose, 2007).

Ovarialkarzinome sollten immer nach diesem Standardtherapieverfahren behandelt werden. Dieses beinhaltet bei Karzinomen im FIGO Stadium I und II operativ zunächst eine Längslaparotomie mit Inspektion des gesamten Bauchraumes. Anschließend erfolgen eine peritoneale Zytologie sowie Biopsien von allen auffälligen oder abnormen Befunden. Weiterhin erfolgt eine Adnexektomie, Hysterektomie, Appendektomie (bei muzinösen Tumoren) sowie eine systematische Lymphknotendissektion (Borges & Schmalfeldt, 2011). Für Patientinnen mit Ovarialkarzinom ab dem FIGO Stadium IIb haben sich folgende Therapiemaßnahmen als effizient erwiesen: Längslaparotomie, Resektion des infra- und suprakolischen Omentum und Begutachtung der Bursa omentalis, Salpingo-oophorektomie, Hysterektomie, Entfernung von tumorinfiltriertem Peritoneum, Entfernung von tumorinfiltrierten Baueingeweiden, Appendektomie sowie systemische Lymphknotendissektion. Außerdem wird eine Aszites-Spülzytologie durchgeführt. Danach erfolgt eine adjuvante, platinbasierte

Chemotherapie (Burges & Schmalfeldt, 2011). Ein fertilitätserhaltendes konservatives Vorgehen wird nur bei Patientinnen in einem FIGO Stadium Ia und einem guten histopathologischen Differenzierungsgrad (G1) für möglich erachtet (Huber et al., 2013). Dabei lässt sich vermuten, dass die Qualität der Operateurs einen entscheidenden Einfluss auf die weitere Prognose und das mediane Überleben der Patientin hat (Harter et al., 2011).

Systemische Therapie

Hinsichtlich der Chemotherapie bei Ovarialkarzinomen sind in den letzten 30 Jahren signifikante Fortschritte zu verzeichnen. Die postoperative, primäre Chemotherapie ist mittlerweile fester Bestandteil der Behandlung von Ovarialtumoren. Sie hat zum Ziel die nach erfolgter Tumorresektion noch im Körper verbliebenen proliferativen Tumorzellverbände zu zerstören. Die aktuelle Standardtherapie beinhaltet 6 Zyklen Carboplatin, in fortgeschrittenen Stadien in Kombination mit Paclitaxel, wobei Dosis und Dauer der Infusion sowie die Anzahl der Zyklen in den einzelnen Behandlungszentren variiert (Covens et al., 2002).

Eine Studie zur Ermittlung einer optimalen Chemotherapie für Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Stadium FIGO II, III und IV zeigt, dass platinhaltige Chemotherapeutika sowohl allein als auch in Kombination am erfolgreichsten das rezidivfreie Gesamtüberleben der Frauen verbessert (Covens et al., 2002; Trimbos et al., 2003). Beim frühen Ovarialkarzinom im Stadium FIGO Ia (G1) ist das Rezidivrisiko ohnehin sehr gering und kann durch Chemotherapeutika nicht gesenkt werden kann .

Neben Carboplatin zusammen mit Paclitaxel stellt Cisplatin in Kombination mit Paclitaxel eine weitere Therapiemöglichkeit dar. Zwischen Carboplatin und Cisplatin konnte in der Monotherapie kein Unterschied ermittelt werden, wobei Carboplatin weniger toxisch in Hinsicht auf Nebenwirkungen wirkt (Covens et al., 2002). Auch Paclitaxel wird von den meisten Patientinnen gut toleriert (Parmar et al., 2003). In den Fällen in denen eine Paclitaxelunverträglichkeit besteht oder Paclitaxel kontraindiziert ist, ist eine Carboplatin-Monotherapie angezeigt (Covens et al., 2002).

Als Alternative zur adjuvanten Chemotherapie existiert noch die Möglichkeit der neoadjuvanten Chemotherapie, die einer operativen Tumorresektion vorangestellt

wäre. Allerdings konnte in den hierzu durchgeführten Studien kein Vorteil durch eine neoadjuvante Therapie festgestellt werden (Bian, Yao, Li, Yi, & Zhao, 2016). Prognose und Gesamtüberleben war für Patientinnen im fortgeschrittenen Tumorstadium für adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie entweder gleich oder sogar schlechter (Bristow & Chi, 2006; Vergote et al., 2013; Vergote, Leunen, & Amant, 2012a, 2012b). Für Patientinnen in hohem Alter oder in schlechtem Allgemeinzustand für die eine primäre Operation ausgeschlossen wird, bleibt die neoadjuvante Therapie jedoch eine Alternative.

Trotz deutlicher Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten von Ovarialkarzinomen, entwickeln die meisten Patientinnen innerhalb kurzer Zeit ein Rezidiv. In diesem Fall hängt das Ansprechen einer erneuten Gabe von platinhaltigen Chemotherapeutika von dem behandlungsfreien Zeitfenster ab, das zwischen Behandlungsbeginn der initialen Chemotherapie und dem erneuten Auftreten des Tumors liegt. Dauert dieses Intervall länger als 6 Monate an, werden viele wiedererkrankte Patientinnen erneut mit Carboplatin und Paclitaxel behandelt. Hier kann mit einem Ansprechen von 20-70 % gerechnet werden (Ferrero et al., 2007; Markman, 2001; Parmar et al., 2003). Frauen bei denen eine Tumorprogression schon während der initialen Chemotherapie zu verzeichnen ist oder die das Rezidiv innerhalb der ersten 6 Monate nach Behandlungsbeginn erhalten haben, zeigen zumeist kein Ansprechen mehr auf eine erneute platinhaltige Therapie. Sie besitzen platinresistente Rezidive, die unter Behandlung platinhaltiger Chemotherapeutika nicht mehr in Remission gehen (Parmar et al., 2003). Da in diesen Fällen zumeist eine allumfassende Zytostatikaresistenz vorliegt, konnte bisher noch keine optimale Therapie ermittelt werden mit der eine Heilung möglich ist (Ferrandina et al., 2008). Ziel der Behandlung bei einem Ovarialkarzinomrezidiv sollte daher vor allem die Verbesserung der Symptome sowie ein Erhalt der Lebensqualität sein.

Eine Alternative zur platinhaltigen Sekundärchemotherapie bietet die Hormontherapie mit Aromatase-Inhibitoren, welche die Produktion von Östrogenen hemmen, die in der Mehrheit der epithelialen Ovarialkarzinomen exprimiert werden. Gemessen an einem Abfall der CA125 Konzentration, konnte in klinischen Studien ein Ansprechen von 35,7 % der Rezidive verzeichnet werden (Bowman et al., 2002; B. R. Rao & Slotman, 1991; Smyth et al., 2007). Allerdings

wird diese Therapie nur bei weit fortgeschrittenen oder austherapierten Rezidiven angewandt, da der Erfolg der Therapie noch nicht mit ausreichend vielen Studien belegt wurde.

Zielgerichtete Therapie

Trotz der Fortschritte in der radikalen Zytoreduktion und der Chemotherapiestrategien bleibt für die Patientinnen mit Ovarialkarzinom ein enorm hohes Risiko an einem Rezidiv zu erkranken. Daher besteht ein großer Bedarf einer neuen, spezifischen Therapieform. Eine solche könnte die molekulare, zielgerichtete Therapie darstellen. Diese Therapie bezieht den Tatbestand mit ein, dass Ovarialkarzinome eine heterogene Gruppe verschiedener Subtypen bieten, die alle mit einem unterschiedlichen klinischen Bild in Bezug auf Chemotherapieansprechen, Metastasierung und Überleben imponieren (Banerjee & Kaye, 2011). Daher beinhaltet die zielgerichtete Therapie die Identifizierung von spezifischen Signalwegen, welche die verschiedenen Subtypen des Ovarialkarzinoms charakterisieren und verspricht dadurch eine höhere Sensitivität und geringere Toxizität (Banerjee & Kaye, 2013). Um das Wirkungsprinzip der zielgerichteten Therapie beispielhaft zu erläutern soll hier näher auf den neusten Wirkstoff, der auf dem Markt erschienen ist, eingegangen werden.

Olaparib gehört zu den PARP-Inhibitoren (Poly(ADP)Ribose Polymerase) und bildet eine Gruppe der zielgerichteten Therapie. Diese neue Substanzklasse ist das einzige, zugelassene Arzneimittel der letzten Jahre für Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom. Es ist ein wirksames Arzneimittel bei Patientinnen mit Nachweis einer BRCA-1 oder -2-Mutation in der Keimbahn oder im Tumorgewebe. Grundlage der Zulassung ist die Auswertung einer randomisierten Phase-II-Studie zum Vergleich einer Erhaltungstherapie von Olaparib versus Placebo. Es zeigte sich, dass Olaparib zu einer hoch signifikanten Verlängerung des progressionsfreien Überlebens sowie zu einer klinisch relevanten Verlängerung der Zeit bis zur Einleitung einer erneuten Chemotherapie führte (Ledermann et al., 2014; Munroe & Kolesar, 2016). Die Inhibitoren verfolgen dabei das Konzept der „synthetischen Letalität“ und eröffnen ein neues therapeutisches Feld indem sie an der Regulation von DNA-Reparaturmechanismen und Zelltod beteiligt sind. Die Inhibition von PARP führt

zu DNA Läsionen, die nur durch intaktes BRCA repariert werden können. Dies erklärt warum vor allem Patientinnen mit BRCA1/2 Mutation ein gutes Ansprechen auf PARP-Inhibitoren zeigen (Audeh et al., 2010; Bryant et al., 2005; Kaye et al., 2012). Somit können selektiv nur Tumorzellen unter Aussparung der normalen Zellen angegriffen werden (Ashworth, 2008; Banerjee & Kaye, 2013).

Neben den Wirkstoffen, die bereits auf dem Markt sind, wie z.B. Bevacizumab, einem humanisierten monoklonalen Antikörper, der sich gegen den VEGF-Rezeptor richtet, laufen derzeit noch eine Vielzahl an Studien, die zum Ziel haben noch weitere Signalwege oder Gene aufzudecken, die eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Chemotherapie vermitteln. Die Identifizierung eröffnet neue Möglichkeiten für Therapiestrategien.

Immuntherapie

Ein weiteres therapeutisches Feld eröffnet sich in der Immuntherapie. Ziel dieser Therapie ist es, eine T-Zellspezifische oder humorale Immunantwort der Patientin zu erzeugen, die sich gegen tumorassoziierte Antigene richtet.

Die Immuntherapie kann bezüglich ihrer Wirkweise in zwei Gruppen eingeteilt werden:

Die erste Gruppe beinhaltet Impfstoffe, die auf komplette Antigene der Tumorzellen abzielen. Diese haben den Vorteil, dass hier eine breite Immunität gegen eine hohe Anzahl von Antigenen erreicht wird und somit u.a. Tumor-Escape Varianten minimiert werden können. Ein Nachteil ist, dass viele der Antigene, die bei der Therapie angegriffen werden, wie z.B. einige Proteine, auch von normalen Zellen exprimiert werden (Coosemans, Vergote, & Van Gool, 2013). Technisch kann diese Methode z.B. durch Verwendung von allogenen Tumorzellen, Tumorlysaten, RNA-Extrakten oder durch Fusion von dendritischen Zellen in Tumorzellen realisiert werden (Chiang et al., 2013).

Die zweite Gruppe bilden Impfstoffe, die sich lediglich auf ein oder mehrere tumorassoziierte Antigene beschränken, die auf der Oberfläche der Tumorzelle vermehrt exprimiert werden. Die Nebeneffekte, dürften bei dieser Methode daher milder sein. Ein Beispiel hierfür liefern die Vakzine Catumaxomab, Abagovomab und Oregovomab bei denen es sich um monoklonale Antikörper handelt, die gegen bestimmte Glykoproteine auf der Zelloberfläche der Ovarialtumorzellen gerichtet

sind, wie z.B. CA125. Dabei beweist sich besonders Catumaxomab als vielversprechender Wirkstoff und ist bereits für die Therapie des malignen Aszites zugelassen (Tse, Collins, Oehler, Zippelius, & Heinzelmann-Schwarz, 2014). Abagovomab und Oregovomab hingegen, die in frühen Studien Hoffnung auf effektives Ansprechen des Tumors boten, weisen in aktuellen Phase III-Studie ein eher enttäuschendes Ergebnis auf (Berek et al., 2009; Reinartz et al., 2004; Sabbatini et al., 2013; Tse et al., 2014). Des Weiteren sind Immun-Checkpoint-Hemmer, wie Ipilimumab oder MDX-1105 im Fokus der Forschung. Diese greifen in die Regulation der T-Zell Inaktivierung ein und verhindern diese. Ob diese Methode möglicherweise für Ovarialkarzinome Erfolg zeigt, wird derzeit in einigen Studien überprüft (Tse et al., 2014).

1.3 Sphäroide

Die Entwicklung von peritonealen Metastasen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist zum größten Teil auf die Fähigkeit von gestreuten Tumorzellen zur Adhärenz und Infiltration der Mesothelzellen des Peritoneums im Bauchraum zurückzuführen. Des Weiteren können vom Primärtumor abstammende gestreute Tumorzellen auch Tumorzellaggregate bilden, welche als sogenannte Sphäroide frei im malignen Aszites schwimmen. Diese können später die Oberfläche des Peritoneums befallen und Metastasen bilden (Shield, Ackland, Ahmed, & Rice, 2009).

Das Konzept der Sphäroide wurde bereits 1971 von Sutherland und Kollegen als Modell vorgestellt (Sutherland, McCredie, & Inch, 1971). In Sphäroiden liegt ein Versorgungsgradient vor, der dazu führt, dass vitale Zellen lediglich in der äußeren Sphäroidrinde vorhanden sind. Weiter im Inneren des Zellkonglomerats findet man Zellen im Ruhezustand, die ab einem kritischen Durchmesser von 500-600 µm einen nekrotischen Kern besitzen. Die Proliferationsunterschiede sind höchstwahrscheinlich auf die schlechter werdende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung in der Sphäroidmitte zurückzuführen. Des Weiteren ist der Katabolitenabtransport aus dem Inneren erschwert (Friedrich, Ebner, & Kunz-Schughart, 2007). Lam und Kollegen untersuchten in ihrer Arbeit ebenfalls das

Proliferationsverhalten der Sphäroide und konnten einen Effekt des ribosomalen Proteins S6 Kinase-beta1 (p70S6-Kinase) auf die Regulation der Sphäroidbildung nachweisen. Die p70S6-Kinase ist ein nachgeschalteter Effektor des PI3K/Akt-Signalweges, einem komplexen Signalweg, der in vielen Zellvorgängen, wie Zellwachstum, -proliferation und Zellstoffwechsel eine Rolle spielt. Auch in der Tumorgenese kann er konstitutiv aktiv sein und zur vermehrten Proliferation sowie verminderter Apoptose führen (Lam, Ip, Mak, & Wong, 2016).

Die Aggregation der Tumorzellen zu einem multizellulären Sphäroid schafft ein ankerunabhängiges Mikroumfeld in vivo, das das Zellüberleben über Zell-Zell-Adhäsion begünstigt. Die Funktion eines Sphäroids scheint dabei wesentlich von der Expression und der Aktivität bestimmter Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (CAMs) abhängig zu sein (Aberle, Schwartz, & Kemler, 1996; Suzuki, 1996). Es handelt sich dabei um Cadherine, deren Expressionsrate die Stärke der Aggregation und die Zelldichte der Sphäroide zu regulieren scheint (Kim et al., 2005). Neben den Zell-Zell-Interaktionen konnte die Ausbildung einer extrazellulären Matrix beobachtet werden, die sich auf die Verteilung und Wirkung von Wachstumsfaktoren und Hormonen auswirken könnte (Friedrich et al., 2007).

Darüber hinaus konnte herausgefunden werden, dass Sphäroidzellen stammzellähnliche Eigenschaften aufweisen. Wie im Kapitel 1.5 *Tumorstammzellen* noch ausführlich besprochen wird, scheinen Tumorstammzellen hauptsächlich für die Tumorgenese, Chemoresistenz und Rezidive verantwortlich zu sein. Diese Eigenschaften stellen die Hauptgründe für die schlechte Überlebensrate bei Tumorerkrankungen dar. Liao und Kollegen weisen in ihrer Arbeit stammzellähnliche Eigenschaften in Sphäroidzellen wie eine Hochregulation von Stammzellgenen, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotenzial sowie eine hohe ALDH-Aktivität nach. Weiterhin zeigten Sphäroidzellen ein aggressiveres Verhalten in Wachstum, Migration, Invasion, Selbsterneuerung und Überleben und waren resistenter gegenüber Chemotherapie (Liao et al., 2014).

Tatsächlich scheinen die Mehrzahl der eingesetzten Chemotherapeutika bezüglich der Beeinflussung von Sphäroidwachstum und Dissemination ineffektiv zu sein. Ma und Kollegen konnten sogar zeigen, dass die Behandlung mit

Chemotherapeutika und anschließende Sphäroidkultur in vitro zu einer deutlichen Anreicherung von molekularen und physiologischen Stammzellmarkern in einer Ovarialkarzinomzelllinie führt (Ma, Lai, Liu, Cheng, & Guo, 2010).

Sphäroide des Ovarialkarzinoms zeigen im Vergleich zu einschichtigen, adhärennten Ovarialtumorzellen eine verminderte Apoptoserate nach Behandlung mit den herkömmlichen Chemotherapeutika sowie Bestrahlung und weisen eine höhere Chemoresistenz auf (L'Espérance, Bachvarova, Tetu, Mes-Masson, & Bachvarov, 2008; Makhija, Taylor, Gibb, & Gerçel-Taylor, 1999). Dies könnte u.a. in einer geringeren Proliferationsrate der Sphäroidzellen begründet werden (Sutherland & Durand, 1976; Sutherland et al., 1971). Es existieren noch weitere Hypothesen, die z.B. interzelluläre Kommunikation, veränderte DNA-Packung sowie die Zellform als mögliche Ursachen für die erhöhte Resistenz aufstellen (Nederman, 1984; Olive & Durand, 1994). Weaver und Kollegen begründen den Effekt durch Integrin-Interaktionen, die über die Ausschüttung des Transkriptionsfaktors NF-KB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) Einfluss auf die Genregulation nehmen (Weaver et al., 2002).

Der Aufbau der Sphäroide mit ihrem ankerlosen Wachstum, ihrer dreidimensionalen Struktur, der Unabhängigkeit vom Gefäßsystem und nicht zuletzt ihr markanter Einfluss auf Tumorprogression, Metastasenbildung und Chemoresistenz machen Sphäroide zu einem anspruchsvollen Angriffsziel der Tumorbehandlung. Die exakten biologischen Mechanismen sind bis heute noch nicht vollständig erforscht und stellen somit ein vielversprechendes Feld neuer Therapiestrategien dar.

1.4 Das Tumorassoziierte Antigen CA125

Tumorassoziierte Antigene sind Oberflächenantigene, die auch in gesunden Zellen gebildet werden, in Tumorzellen jedoch meist überexprimiert sind. Tumorassoziierte Antigene bieten daher ein vielversprechendes Ziel für die Detektion der Tumorzellen und die Therapie.

Das CA125 Antigen wurde erstmals 1981 von Bast und Kollegen bei dem Versuch entdeckt, durch murine monoklonale Antikörper (OC125), die spezifisch mit Zellen

des Ovarialkarzinoms reagieren, eine antikörper-vermittelte Zytotoxizität zu bewirken. Dabei konnte herausgefunden werden, dass die Antikörper für die Therapie zwar nicht geeignet, jedoch in der Lage sind das von malignen Ovarialkarzinomen in die Blutzirkulation abgegebene Antigen CA125 zu erkennen und so die Charakterisierung eines neuen Seruntumormarkers zu ermöglichen (Robert C Bast et al., 1981). Ein immunradiometrischer Assay zur Quantifizierung von CA125 Serumwerten ergab kurz darauf, dass CA125 bei 80 % der Patientinnen mit gesichertem Ovarialkarzinom erhöht war ($> 35 \text{ kU/l}$) und nur bei 1 % der gesunden Probanden Werte über 35 kU/l aufwiesen. Dieser Wert wurde daraufhin als Grenzwert festgelegt (Robert C Bast et al., 1983). Der Assay wurde später durch einen zweiten Assay ersetzt, der neben dem Antikörper OC125 als Detektionskörper den Klon M11 als Fängerantikörper verwendet. Dadurch zeigt er bei ähnlicher Spezifität und Sensitivität weniger tagesabhängige Schwankungen und weist bei niedrigen CA125 Werten eine bessere Messcharakteristik auf (R. C. Bast et al., 1998; M. J. Duffy et al., 2005; Kenemans, Verstraeten, van Kamp, & von Mensdorff-Pouilly, 1995).

1.4.1 Anwendung von CA125 in der Klinik

Der Tumormarker CA125 kommt neben dem Ovar auch in anderen Geweben vor, wie im gesunden Oberflächenepithel von Endometrium, Endocervix und Eileiter sowie in Mesothelzellen der Pleura, im Perikard und Peritoneum (Guppy & Rustin, 2002; T. Meyer & Rustin, 2000). Während der Embryonalentwicklung wird es vom Zölomepithel exprimiert (Robert C Bast et al., 1981).

CA125 ist in der gynäkologischen Praxis momentan der meist genutzte Marker für Ovarialkarzinome. Beim Ovarialkarzinom sind CA125 Serumwerte vom Stadium in dem sich der Tumor befindet abhängig. Während im FIGO Stadium I nur 50 % der Patientinnen einen CA125 Serumwert über 35 kU/l aufweisen sind es in fortgeschrittenen Stadien schon 90 – 94 % (Jacobs & Bast, 1989). Die Sensitivität ist also besonders in frühen Stadien des Ovarialkarzinoms herabgesetzt. Des Weiteren berichten Jacobs und Bast von unterschiedlichen CA125 Serumwerten abhängig vom histologischen Typ des Ovarialkarzinoms, was die Sensitivität und Spezifität zusätzlich reduziert (Jacobs & Bast, 1989).

Weitere Faktoren, die besonders die Spezifität des CA125 Wertes zur Detektion maligner Ovarialkarzinome herabsetzen, werden im Folgenden genannt. Die Serumkonzentration von CA125 kann durch Gefäßinvasion, Gewebeschäden und Entzündungen im Zusammenhang mit einer malignen Erkrankung erhöht sein. Dabei kann es sich um gynäkologische Karzinome (Ovar, Endometrium, Endozervix, Eileiter), aber auch um nichtgynäkologische Neoplasien handeln (Kolon, Leber, Pankreas, Magen, Gallenblase, Nieren, Lunge) (Haga, Sakamoto, Egami, Yoshimura, Mori, et al., 1986).

CA125 kann des Weiteren sowohl bei benignen Erkrankungen sowie physiologischen Zuständen vermehrt exprimiert sein, wie z.B. bei der Menstruation und bei der Schwangerschaft. CA125 ist daher besonders bei prämenopausalen Frauen kein verlässlicher Marker (Haga, Sakamoto, Egami, Yoshimura, & Akagi, 1986; Pittaway & Fayez, 1987). Zu den benignen Erkrankungen bei denen erhöhte CA125 Serumwerte beobachtet wurden gehören Endometriose, Leiomyome sowie entzündliche Erkrankungen des Beckens (Fedele et al., 1989; Paavonen et al., 1989).

Abhängig von den verwendeten Tests sowie dem festgelegten Grenzwert der CA125 Serumkonzentration schwankt die Sensitivität in zahlreichen Studien von 43,3 % (Moore et al., 2008) bis 88 % (Soper et al., 1990). Die Spezifität hingegen unterliegt in den verschiedenen Studien nicht allzu großen Schwankungen und liegt zwischen 83 % (Soper et al., 1990) und 98 % (Skates et al., 2004). Auch wenn CA125 im Gebiet des Screenings bisher noch zu keinem klinischen Einsatz kommt, hat es sich aufgrund seiner ausreichend hohen Spezifität und Sensitivität in der Nachsorge des Ovarialkarzinoms, besonders in der Therapieerfolgskontrolle und der Rezidiverkennung, bewährt.

Wiederholte CA125 Serummessungen sind bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom unter Chemotherapeutikabehandlung zur Überprüfung des Ansprechens des Tumors auf die Therapie sinnvoll (M. J. Duffy et al., 2005). Die Therapieerfolgskontrolle einer Chemotherapie erweist sich als besonders schwierig, da nach radikaler Tumorresektion zumeist nur makroskopisch nicht sichtbare Tumorinseln im Körper verbleiben, die durch Palpation oder bildgebende Verfahren nur schwer zu detektieren sind. Studien zeigen allerdings,

dass die CA125 Serumkonzentration mit einer Tumorregression sinkt und mit einer Tumorprogression steigt (R. C. Bast et al., 1998; Michael J. Duffy, 2004). Fallende CA125 Werte bieten daher einen deutlichen Hinweis auf einen zumindest partiellen Therapieerfolg. Die Gynecological Cancer InterGroup (GCIG) empfiehlt zur Evaluation des Ansprechens auf die Therapie mittels Serumkonzentrationsmessungen von CA125 folgende Anwendung: von einem vollständigen Ansprechen der Therapie kann ausgegangen werden, wenn der CA125 Wert im Normalbereich an zwei aufeinander folgenden Tests mit einem Monat Abstand liegt sowie in bildgebenden Verfahren kein Hinweis auf ein Rezidiv vorliegt. Ein teilweises Ansprechen liegt vor, wenn der CA125 Wert an zwei aufeinander folgenden Tests um 50 % abfällt. Von einem Fortschreiten der Erkrankung kann gesprochen werden, wenn sich der CA125 Wert im Vergleich zum Tiefstwert verdoppelt hat (G. Rustin et al., 2004). Allerdings scheint eine Tumorprogression auch bei steigenden Werten im Normalbereich möglich zu sein. Eine Studie mit Patientinnen deren CA125 Werte zwar steigend, jedoch noch im Normalbereich waren, zeigten eine hohe Rate an Rezidiven nach 4 – 24 Monaten (Wilder et al., 2003). Letztendlich kann die postoperative Messung der CA125 Werte im Kontext mit klinischen Kriterien die Entscheidung ,ob eine postoperative Behandlung fortgesetzt oder abgebrochen werden soll, erleichtern.

Des Weiteren wird in der Literatur der Wert von regelmäßigen CA125 Serumbestimmungen nach initialer Chemotherapie diskutiert, um Rückschlüsse auf eventuelle Rezidive oder Metastasenbildung geben können (M. J. Duffy et al., 2005). Eine Zunahme des CA125 Serumwertes kann bei ca. 70 % der Patientinnen mit behandeltem Ovarialkarzinom ein Hinweis auf ein Rezidiv sein. Für die frühe Erkennung des Rezidivs ist die sogenannte „lead time“, die Zeit zwischen der erstmals gemessenen Erhöhung des Tumormarkers und dem apparativen bzw. klinischen Nachweis des Rezidivs von Bedeutung (Tuxen, Sölétormos, & Dombernowsky, 2002). Allerdings fand eine Arbeitsgruppe in einer randomisierten Studie darin keinen Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens der betroffenen Patientinnen bei einem Frührezidiv (G. J. S. Rustin et al., 2010). Frauen mit Spätrezidiv haben dagegen durch ein besseres Ansprechen der Sekundärtherapie einen signifikanten Überlebensvorteil und können daher von

einem frühen Erkennen des Rezidivs durch regelmäßige CA125 Serumbestimmungen profitieren.

1.4.2 Der molekulare Aufbau von CA125

Es dauerte noch viele Jahre nach der Entdeckung von CA125 bis zwei unabhängigen Forschergruppen die Klonierung des korrespondierenden Gens gelang und die Molekularstruktur aufgeklärt werden konnte (T. J. O'Brien et al., 2001; B. W. Yin & Lloyd, 2001). Yin und Lloyd gelang die Isolation und Klonierung einer langen, partiellen cDNA aus einer Zelllinie eines Ovarialkarzinoms, die große Ähnlichkeit mit der Familie der Muzine besaß und die mit dem CA125 Antigen korrespondierte. Aufgrund der Ähnlichkeit wurde die Sequenz Mucin 16 (MUC16) genannt. In einer weiteren Studie wurde die Identität von MUC16 und CA125 bestätigt (B. W. T. Yin, Dnistrian, & Lloyd, 2002). Über RNA-Isolierung, spezifische PCR-abhängige cDNA-Amplifizierung, Cyanogenbromidbehandlung und Expression rekombinanter Domänen in E.coli-Zellen gelang O'Brien und Kollegen zur gleichen Zeit ebenfalls die Charakterisierung von CA125.

Basierend auf den zwei Studien ist CA125 ein membrangebundenes, mucin-ähnliches Glykoprotein, das mit dem Epithel über eine Transmembran-Domäne verankert ist. Durch enzymatische Prozesse wird es höchstwahrscheinlich in Form löslicher Fragmente in den Extrazellulärraum und somit in die zirkulierende Blutbahn abgegeben.

Strukturell besteht das CA125 Molekül aus drei Domänen: einem kurzen zytoplasmatischen, carboxylierten Teil, einem transmembranen Teil und einem großen extrazellulären, glykolisierten Teil, der den Aminoterminus bildet. Die extrazelluläre Domäne imponiert im Verhältnis zu den anderen Domänen besonders durch seine Größe. Abhängig vom Ausmaß der Glykolisierung dieser Domäne kann sich das Molekulargewicht von CA125, dessen Kernprotein ohnehin schon aus 2,5 Millionen Dalton besteht, auf insgesamt mehr als 5 Millionen Dalton verdoppeln (Timothy J O'Brien, Beard, Underwood, & Shigemasa, 2002). Der Kohlenhydratanteil wird dabei auf ca. 77 % geschätzt (Lloyd, Yin, & Kudryashov, 1997). Zusammen mit einem Proteinanteil von 22152 Aminosäuren ist CA125 damit in der Gruppe der membrangebundenen Muzine das bei weitem größte Glykoprotein (Timothy J O'Brien et al., 2002). Für die hohe Kapazität zur

posttranslationalen O-Glykolisierung sind serin-, threonin- und prolinreiche Sequenzen am Aminoterminal der extrazellulären Domäne verantwortlich. Des Weiteren befindet sich im Bereich der extrazellulären Domäne nahe der Zellmembran bis zu 60 tandem repeat Einheiten, die jeweils aus 156 Aminosäuren bestehen und die als Epitope die Antikörper OC125 und M11 binden können (T. J. O'Brien et al., 2001). Zwischen den tandem repeat Einheiten und der transmembranären Domäne befinden sich verschiedene SEA-Domänen (S= sea urchin, E= Entrokinase, A= Agrin), welche als proteolytische Schnittstelle zur Spaltung und Sezernierung von CA125 von der Zelloberfläche in den Extrazellulärraum dienen könnten (B. W. Yin & Lloyd, 2001). Hierbei ist der genaue Mechanismus der Sekretion noch nicht geklärt. Da CA125 in der Zelle normalerweise in einem phosphorylierten Zustand vorliegt, aber kurz vor der Abspaltung dephosphoryliert wird, konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Freisetzung durch Phosphorylierung reguliert wird (Fendrick et al., 1997). Des Weiteren wurden intrazelluläre Signalwege nachgewiesen, die die Phosphorylierung und somit Freisetzung beeinflussen. Hierzu gehören u.a. der Wachstumsfaktor EGF, die Proteinkinase A, Proteinkinase beta, und Tyrosin Phosphatasen (Lloyd & Yin, 2001).

1.4.3. Die Funktion von CA125

Allgemein stellt die Hauptaufgabe der membrangebundenen Muzine der Schutz der Zelle vor chemischen, physikalischen und mechanischen Reizen dar. Die hohe Wasserbindungskapazität der Polysaccharide in der extrazellulären Domäne der Muzine schützt das zentrale Protein vor Proteolyse, Apoptose, Chemotherapeutika und bietet Schutz vor dem eigenen Immunsystem (Constantinou, Danysh, Dharmaraj, & Carson, 2011). Des Weiteren sind Muzine in der Lage Zytokine, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle zu binden. Die Funktion und die genauen molekularen Mechanismen des Muzins CA125 sind aufgrund seiner enormen Größe bis heute weitestgehend unklar. Es konnte jedoch vor kurzem herausgefunden werden, dass CA125 ein multifunktionales Molekül mit verschiedenen Domänen ist, das in bestimmten Signalwegen involviert ist (Q. Liu et al., 2016). Es konnten verschiedene Moleküle identifiziert werden, an denen CA125 bindet. Ein Oberflächenmolekül, das im Extrazellulärraum mit CA125

interagiert, stellt das Glykoprotein Mesothelin dar. Es wird von Mesothel- und Tumorzellen verstärkt exprimiert. Es konnte herausgefunden werden, dass CA125 spezifisch an Mesothelin bindet und somit die Zelladhäsion beeinflussen kann. Über den Vorgang der Adhäsion von Tumorzellen an mesotheliales Epithel kann u.a. die Metastasenbildung von Ovarialkarzinomen gefördert werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass CA125 und Mesothelin in Ovarialkarzinomzellen im fortgeschrittenen Stadien coexprimiert werden (Rump et al., 2004). Die tumorspezifische Mesothelinexpression könnte somit einen neuen Angriffspunkt für monoklonale Antikörper bieten und stellt damit eine neue Möglichkeit der Therapie von Ovarialkarzinomen dar (Tang, Qian, & Ho, 2013).

Weiterhin konnte herausgefunden werden, dass CA125 mit dem Rezeptor Siglec-9 von Immunzellen interagiert, der wiederum die Tumor- Immunzellinteraktionen beeinflusst (Belisle et al., 2010).

Außerdem wurde bewiesen, dass CA125 ein wichtiger Regulator der Tumorgenese bei Ovarialkarzinomen ist sowie eine wichtige Rolle für dessen Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung spielt (Giannakouros, Comamala, Matte, Rancourt, & Piché, 2015; Thériault et al., 2011). Dabei scheint insbesondere die carboxyterminale Domäne von CA125 in Bezug auf Wachstum, Invasion und Zelladhäsion eine wichtige Rolle zu spielen (T. D. Rao et al., 2015). Des Weiteren konnten Liu und Kollegen herausfinden, dass CA125 über seine Interaktion mit beta-catenin, den Wnt-Signalweg aktivieren kann und somit die Tumorgenese und die Fähigkeit zur Metastasierung beeinflusst (Q. Liu et al., 2016). In einer weiteren Studie wurden Proliferation, Zellzyklus und Apoptoseraten von CA125 positiven Ovarialtumorzellen im Vergleich zu CA125 supprimierten Ovarialtumorzellen untersucht. Die Suppression von CA125 wurde hierbei durch eine transiente und eine stabile Transfektion mit dem Ziel eines CA125 Knockdowns in den transfizierten Zellen erreicht. Dabei konnte für die transient transfizierten Zellen gezeigt werden, dass das Zellwachstum der CA125 Knockdownzellen im Vergleich zu den CA125-positiven Zellen durch Induktion einer caspasen-abhängigen Apoptose deutlich gehemmt wurde. Die stabile Transfektion bewirkte in den Knockdown-Zellen hingegen eine caspasen-unabhängige Apoptose sowie eine verminderte Klonogenität (Reinartz, Failer, Schuell, & Wagner, 2012).

Zusammenfassend nimmt CA125 eine zentrale Rolle am Überleben, Zelladhäsion, Apoptose, Zellproliferation und Progression von Ovarialkarzinomzellen ein. Für

die vollständige Entschlüsselung der physiologischen Funktion von CA125 oder gar der Etablierung einer zielgerichteten Therapie dessen Angriffspunkt CA125 beinhaltet bedarf es allerdings noch einer stetigen Erweiterung des Verständnisses über die Interaktion mit verschiedenen Signalwegen in Tumorzellen.

1.5 Tumorstammzellen

Die Existenz von Tumorstammzellen (Cancer stem cells, CSC) wurde erstmals in einer 1997 von Bonnet und Dick aufgestellten Theorie zur Entstehung der myeloischen Leukämie beschrieben, dessen zentrales Element hoch tumorigene Zellen mit Eigenschaften der Selbsterneuerung und Differenzierung sind (Bonnet & Dick, 1997). In den folgenden Jahren konnten Tumorstammzellen in fast allen soliden Tumoren nachgewiesen werden (Visvader & Lindeman, 2008). Laut der Tumorstammzellhypothese sind Tumorstammzellen nicht nur hauptsächlich für die Tumorgenese verantwortlich, sondern sorgen auch für die Resistenz maligner Tumore und für deren Rezidive, was neben einer späten Diagnose die Hauptgründe für eine schlechte Überlebensrate bei Tumorerkrankungen darstellt (Visvader & Lindeman, 2008).

Gegenstand aktueller Forschung ist daher die Suche nach tumorstammzell-spezifischen Oberflächenmarkern sowie Signalwegen, die Tumorstammzellen von normalen Zellen bzw. normalen Stammzellen unterscheiden. Erkenntnisse dieser Art vertiefen das Verständnis der Onkogenese und wecken die Hoffnung auf Therapien, die sich nebenwirkungsarm und spezifisch nur gegen Tumorstammzellen richten und somit eine Möglichkeit der effektiven Tumoreliminierung bieten.

1.5.1 Das Tumorstammzellmodell

1997 wurde das Tumorstammzellmodell zunächst von Bonnet und Dick beschrieben und erhielt weltweite Aufmerksamkeit. Laut ihrer Hypothese unterliegt die Tumorgenese einer streng hierarchischen Organisation, an dessen

Spitze eine kleine Subpopulation von Tumorstammzellen steht (Bonnet & Dick, 1997; Visvader & Lindeman, 2008).

Tumorstammzellen gehören zu einer kleinen Subgruppe von Tumorzellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und somit für das kontinuierliche Tumorstammwachstum verantwortlich sind. Dabei können aus den Tumorstammzellen entweder weitere Tumorstammzellen, aber auch vor allem nicht-tumorigene Zellen hervorgehen, die den größten Teil der Tumormasse ausmachen (Visvader & Lindeman, 2012). Dieser Vorgang wird als asymmetrische Zellteilung bezeichnet (Boman & Wicha, 2008) und trägt maßgeblich zur Aufrechterhaltung des Tumors bei. Die Tumorstammzellen müssen dabei nicht zwangsweise von normalen Stammzellen abstammen, haben jedoch wesentliche Eigenschaften wie die Selbsterneuerung und ein Differenzierungspotential mit ihnen gemein. Vielmehr könnten Tumorstammzellen von transformierten Progenitorzellen hervorgehen (Visvader & Lindeman, 2008). Darüber hinaus berichten Visvader und Kollegen von einer Möglichkeit der retrograden Entwicklung, bei der sich weiter differenzierte Tumorzellen wieder zu Tumorstammzellen zurückentwickeln (Visvader & Lindeman, 2012). Zusätzlich wird vermutet, dass eine weitere Anreicherung von epigenetischen Mutationen durch neoplastische Veränderungen für die Entstehung der Tumorstammzellen verantwortlich ist (Visvader, 2011).

Neben dem Tumorstammzellmodell soll in diesem Rahmen noch eine zweite Hypothese erwähnt werden. Novell und Kollegen berichten 1976 vom Prinzip der klonalen Evolution, bei dem Mutationen in Tumorzellen für einen selektiven Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen sorgen. Diese Zellen bilden eine dominante Tumorzellpopulation, in der jeder Klon die gleiche tumorgenetische Wachstumskapazität besitzt und somit für die Tumorgenese verantwortlich ist (Visvader & Lindeman, 2012). Die Tumorgenese unterliegt im Gegensatz zum Stammzellmodell keiner hierarchischen Struktur.

Hierbei ist wichtig zu vermerken, dass sich beide Hypothesen nicht gegenseitig ausschließen (Visvader & Lindeman, 2008). Vielmehr scheinen Tumorstammzellen ebenfalls einer klonalen Evolution zu unterliegen, wie Barabé und Kollegen bereits für leukämische Stammzellen zeigen konnten (Barabé, Kennedy, Hope, & Dick, 2007). Somit lässt sich vermuten, dass das Tumorstammzellmodell, in

Kombination mit dem Prinzip der klonalen Evolution, am besten die tatsächliche Tumorentwicklung beschreibt (Visvader & Lindeman, 2012).

1.5.2 Eigenschaften von Tumorstammzellen

Die aktuelle Tumorbehandlung scheint mit Chemotherapie und Strahlenbehandlung bei fortgeschrittenen Karzinomen oft keinen oder zumindest nicht den gewünschten Erfolg zu erzielen. Die herkömmliche Therapie ist zwar im Stande, einen Großteil der Tumormasse effizient zu eliminieren, belässt jedoch eine kleine Population resistenter Tumorstammzellen, die später für das Reservoir von Tumorzellen sorgt, die für ein Rezidiv des Tumors verantwortlich sind (Pardal, Clarke, & Morrison, 2003; Trumpp & Wiestler, 2008). Tumorstammzellen haben dabei viele Eigenschaften von normalen Gewebestammzellen gemein und nutzen diese zur Tumorgenese und zum Schutz vor Chemo- oder Strahlentherapie.

Die wichtigste Eigenschaft von somatischen Stammzellen ist die Fähigkeit, sich selbst und eigenständig zu teilen. Diese Eigenschaft ist besonders in Geweben mit hohem Zellverschleiß wie Schleimhäuten im Gastrointestinaltrakt oder generell bei Gewebedefekten von hoher Bedeutung. Die Selbsterneuerung der Stammzellen wird dabei allerdings durch bestimmte Wachstumsstimuli kontrolliert und beinhaltet die konstante Beibehaltung der Zellzahl des Stammzellpools und des neugebildeten Gewebes (Boman & Wicha, 2008; Trumpp & Wiestler, 2008).

Tumorstammzellen, bei denen durch Mutation die Kontrolle der Wachstumsstimuli ausfällt, machen sich diese Eigenschaft zu Nutze, um ungehindert zu proliferieren.

Außerdem besitzen somatische Stammzellen das Potenzial zur multipotenten Differenzierung. Auch diese Eigenschaft übernehmen Tumorstammzellen. Dies beweist die Erkenntnis, dass Karzinome vielfältig differenzierte Zelltypen enthalten und sich jeweils dem Gewebe angleichen können, in dem ihre Population aufwächst (Boman & Wicha, 2008).

Ursache der Resistenz gegenüber herkömmlichen Therapieverfahren wie der Chemotherapie und der Bestrahlung ist wahrscheinlich eine Kombination verschiedener stammzellähnlicher Merkmale, wie dem Zellruhezustand, der

effizienten DNA-Reparatur, einer hohen Expression von multidrug-resistance-type-Membran-Transporter und deren Schutz in einem hypoxischen Gewebeareal (Trumpp & Wiestler, 2008). Ähnlich der somatischen Stammzellen haben Tumorstammzellen die Fähigkeit über Monate hinweg in einer G₀-ähnlichen Zyklusphase zu verharren, in der sie nicht weiter proliferieren. Hierdurch ergibt sich ein entscheidender Überlebensvorteil in der Chemo- und Strahlentherapie, die auf stark proliferierende Zellen abzielt (Boman & Wicha, 2008; Trumpp & Wiestler, 2008). Des Weiteren sind Tumorstammzellen durch eine Induktion von Checkpointkinasen in der Lage, einen Arrest des Zellzyklus in der G₀ Phase hervorzurufen und so eine effektivere DNA-Reparatur durchzuführen (Trumpp & Wiestler, 2008). Dabei befinden sich die Stammzellen meist in einem speziellen, hypoxischen Mikromilieu, der sogenannten Stammzellnische. Besagte Stammzellnischen scheinen auch Tumorstammzellen als ideales Schutzschild zu dienen, das diese beispielsweise für Chemosubstanzen weniger angreifbar macht (Brown & Giaccia, 1998; Trumpp & Wiestler, 2008).

1.5.3 Tumorstammzellmarker

Die bisher erlangten Forschungserkenntnisse lassen die Vermutung zu, dass Marker, die Tumorstammzellen zuverlässig identifizieren können, die herkömmlichen Therapiemöglichkeiten und die Prognose des Krankheitsverlaufs verbessern könnten. Jedoch ist es bisher noch nicht gelungen spezifische Marker oder eine Kombination von Markern zu finden, mit deren Hilfe sich die Gesamtheit der Tumorstammzellen eindeutig identifizieren lässt. Dabei handelt es sich meistens um membrangebundene Glykoproteine, sogenannte Clustermoleküle (CD, Cluster of differentiation), die teilweise zellspezifisch exprimiert werden und die unterschiedliche Funktionen haben können. In der Literatur werden die Glykoproteine CD133, CD24, CD44 sowie der Stammzellfaktor CD117 vielfach als mögliche Marker für Tumorstammzellen diskutiert (Kryczek et al., 2012; Silva et al., 2011). Seit einiger Zeit ist man auf einen funktionellen Marker aufmerksam geworden, welcher in Stammzellen maligner und benigner Gewebe exprimiert wird. Dabei handelt es sich um die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), einem Enzym, dessen erhöhte Aktivität in Zellen mit Stammzeleigenschaften gemessen wurde. Schon 1995 wurde sie als Marker für hämatopoetische und leukämische

Stammzellen vorgeschlagen (Jones et al., 1995). Aktuell zählt man 17 Enzymisoformen zur ALDH-Superfamilie, die anhand ihrer Aminosäuren eingeteilt werden (Vasiliou, Bairoch, Tipton, & Nebert, 1999). Dabei ist die ALDH Enzymfamilie primär in Phase-1-Reaktionen der Biotransformation involviert, wo sie oxidativ die von Pyridinnukleotiden abhängige Umwandlung der Aldehyde in Säuren katalysiert.

Laut Silva und Kollegen ist eine erhöhte Expression der Aldehyd-Dehydrogenase 1 in diversen soliden Tumoren zu beobachten. Dabei konnte ein hohes Tumorwachstum in ALDH⁺/CD133⁺ beobachtet werden, das mit einem schlechteren medianen Überleben einhergeht (Silva et al., 2011). Diesen Beobachtungen können sich auch Kryczek und Kollegen anschließen. In ihrer Arbeit konnten für ALDH1 und CD133 zuverlässig erhöhte Expressionsraten in Ovarialtumorzellen festgestellt werden, die die Fähigkeit zur Sphäroidbildung und somit tumorigenes Potenzial besaßen (Kryczek et al., 2012). Allerdings existieren in der Literatur auch widersprüchliche Daten zur ALDH Expression und zur klinischen Prognose beim Ovarialkarzinom, sodass ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der ALDH-Expression und dem Vorkommen von Tumorstammzellen bisher noch nicht hergestellt werden konnte (Chang et al., 2009; S. Liu et al., 2013).

Das menschliche Glykoprotein CD133 (Prominin) ist ein Transmembranprotein, dessen Funktion bis heute noch weitgehend unbekannt ist, wohl aber mit bestimmten Membranmikrodomänen im Gastrointestinaltrakt assoziiert ist (Fargeas, Karbanová, Jászai, & Corbeil, 2011). Zudem konnte bereits in den letzten Jahren gezeigt werden, dass CD133 zur Identifikation von Tumorstammzellen geeignet ist. Dabei galt CD133 zunächst als Marker für Glioblastome. Hierbei stellte sich heraus, dass nur die CD133⁺ Subpopulation gegenüber einer CD133⁻ Subpopulation von Tumorzellen die Fähigkeit zur Tumorgenese besaß (Climate, Dyck, Phylogenies, & Compare, 2004; Lathia et al., 2011). Darüber hinaus konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die CD133-Expression mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist und besonders in Ovarialkarzinomen mit einer fortgeschrittenen Chemoresistenz gegenüber Platin-basierten Chemotherapeutika einhergeht (Baba et al., 2009).

CD44 findet sich bei den meisten Wirbeltieren und ist an der Regulation zellulärer Prozesse wie Zelluntergang, Motilität, Wachstum und Differenzierung beteiligt. Durch alternatives Splicing und post-translationale Prozesse, die vom Zelltyp und von Wachstumsbedingungen abhängen, sind CD44 Proteine sehr heterogen, obwohl das kodierte Gen stark konserviert ist (Ponta, Sherman, & Herrlich, 2003). Es konnte herausgefunden werden, dass die Höhe des CD44⁺/CD24⁻ Zellanteils in Ovarialkarzinomen scheinbar mit der Aggressivität des jeweiligen Tumors korreliert. CD44⁺/CD24⁻ Zellen zeigen dabei ein fortgeschrittenes Differenzierungspotenzial sowie eine 60-fach erhöhte Invasionstendenz im Vergleich mit anderen Phänotypen auf. Darüber hinaus scheinen CD44⁺/CD24⁻ Zellen eine signifikante Chemoresistenz gegenüber den herkömmlichen Chemotherapeutika aufzuweisen und haben ein schlechteres medianes Überleben (Meng et al., 2012). Dabei ist CD24 ein Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten exprimiert wird und ebenfalls mit der Identifikation von Tumorstammzellen assoziiert ist. Allerdings sind die Ergebnisse in der Literatur bezüglich einer Über- und einer Unterexpression von CD24 in Tumorstammzellen sehr konträr (Meng et al., 2012; Shen et al., 2016).

CD117, auch bekannt als c-kit, ist ein weiterer Marker, der schon in Zellen mit Stammzeleigenschaften diverser solider Tumore identifiziert wurde. Bapat und Kollegen isolierten Tumorzellen aus dem Aszites von an Ovarial-CA erkrankten Patientinnen und konnten in diesen Zellen eine erhöhte Expression von sowohl CD44 als auch CD117 feststellen (Bapat, Koppikar, & Kurrey, 2005). Eine weitere Arbeitsgruppe analysierte in Sphäroiden generierte chemoresistente Zellen aus dem Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen und fanden auch hier eine erhöhte CD117-Expression (Zhang et al., 2008).

Auch wenn das Tumorstammzell-Konzept schon jetzt klinisch relevante Erkenntnisse erzielen konnte, weist alles darauf hin, dass zunächst eine umfassende Tumorstammzell-Identifikation und Charakterisierung erfolgen muss, um mittels Tumorstammzellmarkern eine effiziente Therapie zur Eliminierung des Tumors und seiner Rezidive zu ermöglichen (Visvader & Lindeman, 2012).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern die Expression bestimmter Tumorstammzellmarker mit dem tumorassoziierten Antigen CA125 in

Ovarialkarzinomzellen zusammenhängt und inwiefern CA125 in der Lage ist Tumorstammzeleigenschaften wie Chemoresistenz und Sphäroidbildung zu beeinflussen.

2 Material

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien, Puffer und sonstige Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Absolute qPCR Sybr Green Mix 2x	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Agarose Bacteriological	Gibco Brl
Agarose, Biozym LE	Carl Roth GmbH & CO. KG
Ampicillin trihydrate	Serva Gelelectrophoresis GmbH
Aqua dest., Wasser für Injektionszwecke	Serumwerk
Bromphenolblau	Serva Gelelectrophoresis GmbH
BSA (Bovine Albumin, Cohn Modified)	ICN, Biomedicals
CaCl ₂ (Calciumchlorid-2 hydrat Kristalle)	Merck KGaA
Carboplatin (10mM)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Citric acid (Zitronensäure)	Merck KGaA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/Ham's F12 mit Glutamin	PAA Laboratories GmbH
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/Ham's F12 without Glutamin, without Phenolred	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Dulbecco's PBS w/o Ca, Mg	PAA Laboratories GmbH
EDTA (Dinatriumsalz Dihydrat)	Carl Roth GmbH & CO. KG
EGF, Lypophilized; (100ug/ml) in PBS, rekombinant, human	Invitrogen; Life Technologies Corporation
Eisessig (Essigsäure mind. 98,8%)	Riedel-de Haen
Ethanol absolut, puriss., p.a.	Merck KGaA
Ethanol absolut, vergällt mit EMK	Fischar
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Co. LLC.
FACS Clean solution	BD Biosciences
FACS Rinse solution	BD Biosciences
FBS (Fetales Bovines Serum), Standard Quality, EU approved	PAA Laboratories GmbH
FGFb/FGF-2 (100ug/ml) in PBS; Rekombinant, human	Immuno Tools GmbH
Glycin (2,5M)	Carl Roth GmbH & CO. KG
G418 Sulphate	PAA Laboratories GmbH
HEPES, Insulin Solution from Bovine Pancreas	Sigma-Aldrich Co. LLC.

(10mg/ml), pH 8,2	
HCL (Salzsäure) 2M	Merck KGaA
Mc Coy's 5A Medium with Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Methanol, puriss., p.a.	Sigma-Aldrich Co. LLC.
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
MTT Powder (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
MTT Reagenz (5mg/ml)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Gelelectrophoresis GmbH
Natrium-Pyruvat (100mM)	PAA Laboratories GmbH
Opti-MEM (I Reduced Serum Media)	Gibco Brl
Paclitaxel (5mM)	Adipoben International
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH
RPMI 1640 Powder with L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
RPMI 1640 with Phenol Red, with L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
RPMI 1640 without Phenol Red, with L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Trypan blue Powder	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Trypsin 0,05%-EDTA, 0,2 % in PBS	PAA Laboratories GmbH

2.1.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Aldefluor™ Kit	STEMCELL™ Technologies
- Aldefluor™ Puffer	
- Aldefluor™ Reagenz	
- Chlorwasserstoff /HCL), 2N	
- DEAB Reagenz, 1,5 mM in 95% Ethanol	
- Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Lipofectamine [®] LTX and Plus Reagent Kit	Invitrogen™
- Lipofectamine™ LTX Reagent	
- Plus™ Reagent	

2.1.3 Antikörper, Marker

Bezeichnung	Bezeichnung	Hersteller
hCD44-FITC 1mL	Maus IgG1, monoklonal Klon: DB105	Miltenyi Biotec GmbH
hCD24-PE 1mL	Maus IgG1, monoklonal Klon:32D12	Miltenyi Biotec GmbH
hCD133/2 -APC 1mL	Maus IgG1, monoklonal Klon:293C3	Miltenyi Biotec GmbH
Monoclonaler anti Mucin-16 Antikörper	Maus IgG1 Klon: x75 (3C8/4)	AcrisAntibodiesGmbH
Isotyp Maus-APC 1mL	Maus IgG2a	Miltenyi Biotec GmbH
Isotyp Maus-FITC 1mL	Maus IgG1	Miltenyi Biotec GmbH
Isotyp Maus-PE 1mL	Maus IgG2a	BD Biosciences
Mouse Gamma Globulin	Maus IgG	Dianova GmbH
Sekundärantikörper		
Anti Maus-FITC	Anti-Maus IgG	eBioscience

2.1.4 Bakterien, Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	Hersteller
OAW-42	Ovar, Adenokarzinom	ECACC, UK

2.1.5 Primer und Plasmide

Bezeichnung	Hersteller
Sure Silencing shRNA Plasmide, Plasmide 1,2,3,4,NC	SABioscience, USA

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
FACS tubes, Polystyren, steril	BD Biosciences
Gewebekulturflaschen, steril, 25 cm ²	Greiner-Bio-One GmbH
Gewebekulturflaschen, steril, 75 cm ²	Greiner-Bio-One GmbH
Gewebekulturflaschen, steril, 175 cm ²	Greiner-Bio-One GmbH
Kulturplatte, 6-Well	Greiner-Bio-One GmbH
Kulturplatte, 24-Well	Greiner-Bio-One GmbH
Kulturplatte, 96-Well	Greiner-Bio-One GmbH
PCR Platte, 96-Well, 0,2 ml, non skirted	Thermo Fisher Scientific, Inc.
PCR Film	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Pipettenspitzen Finntip, 0,2-1 ml	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Pipettenspitzen Finntip flex, 0,1- 1ml	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Pipettenspitzen Finntip, mit Filter, 0,01 ml	Nerbe plus GmbH
Pipettenspitzen Finntip, mit Filter, 0,1 ml	Nerbe plus GmbH
Pipettenspitzen Finntip, mit Filter, 1 ml	Nerbe plus GmbH
Pipetten, serologisch, 1 ml	Greiner-Bio-One GmbH
Pipetten, serologisch, 2 ml	Greiner-Bio-One GmbH
Pipetten, serologisch, 5 ml	Greiner-Bio-One GmbH
Pipetten, serologisch, 10 ml	Greiner-Bio-One GmbH
Pipetten, serologisch, 25 ml	Greiner-Bio-One GmbH
Pipetten, serologisch, 50 ml	Greiner-Bio-One GmbH
Zentrifugenröhrchen, Falcon 15 ml	Sarstedt AG & Co.
Zentrifugenröhrchen, Falcon 50 ml	Sarstedt AG & Co.

2.2 Verwendete Geräte und Software

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Axio Observer Z1	Mikroskop	Carl Zeiss AG
<i>Axio Vision</i>	<i>Programm, Version 4.8</i>	<i>Carl Zeiss AG</i>
Axiovert CFL	Mikroskop	Carl Zeiss AG
Bio-II-A	Sterilbank	Telstar S.A
FACS Calibur E5569	Durchflusszytometer	BD Biosciences
<i>CellQuest Pro</i>	<i>Programm, Version 4.0.2</i>	<i>BD Biosciences</i>
Explorer Pro	Feinwaage	Ohaus Europe GmbH

GFL-1083	Schüttelwasserbad	GFL GmbH
Heraeus Biofuge fresco	Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Hera cell 150	CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Heraeus UT6	Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Lab dancer	Vortexer	VWR International GmbH
MoFlo™ high perform. cell sorter	FACS	Beckman Coulter, Inc.
Multifuge 3S-R	Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Multiskan Ascent	Mikroplatten Photometer	Thermo Fisher Scientific, Inc.
<i>Multiskan Ascent</i>	<i>Programm, Version 2.6</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Inc.</i>
Neubauer chamber	Zählkammer	la fontaine
PerfectSpin 24R	Tischzentrifuge, kühlbar	peqlab, Biotechnologie
Stratagene Mx3005P (max.17.136xg)	qPCR Cyclor	Agilent Technologies GmbH
<i>Stratagene MxPro</i>	<i>Programm, version 4.1</i>	<i>Agilent Technologies GmbH</i>
Techne Dri-Block DB-3	Heizblock	Sigma-Aldrich Co. LLC.

2.3 Zellkulturmedien und Pufferzusammensetzungen

Bezeichnung	Komponenten
Cellwash 2%	Aqua; 2% FCS
Cellwash 5%	Aqua; 5% FCS
FACS Staining Buffer	PBS; 1% FCS
RPMI Standardmedium	RPMI 1640; 10% FCS; 1% Natrium-Pyruvat; 1% Penicillin/Streptomycin
RPMI Standardmedium (phenolrotfrei)	RPMI 1640 (phenolrotfrei); 10% FCS; 1% Natrium-Pyruvat; 1% Penicillin/Streptomycin
MTT-Solubilisierungspuffer	10% SDS in 0,01 M HCL; steril filtriert
Sphäroidmedium	DMEM/Ham's F12; 5ug/ml Insulin; 20ng/ml rhEGF; 10 ng/ml rhFGF-b; 0,4% BSA; 1% Penicillin/Streptomycin

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinie

Die OAW42-Zelllinie wurde aus dem Aszites von Patienten kaukasischer Abstammung mit Adenokarzinom des Ovars gewonnen. Es handelt sich histologisch um ein papilläres Zystadenokarzinom des Ovars. Die Zelllinie ist in der ECACC (European Collection of Cell Culture) hinterlegt und wurde dort erworben.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei verschiedene Subklone der Zelllinie OAW42 verwendet, dessen Subklonierung aufgrund einer instabilen CA125 Expression erfolgte und die sich daher in der Höhe ihrer jeweiligen CA125 Expressivität unterscheiden.

Der Subklon OAW42-H8⁺ weist eine ausgesprochen hohe CA125 Expression auf, der Subklon OAW42-B8⁻ hingegen exprimiert im Vergleich hierzu weniger CA125.

In Kultur weisen die Subklone ein unterschiedliches Wachstum auf. Die Zellen der OAW42-H8⁺ Zelllinie verdoppeln sich in Kultur im Schnitt alle 3-4 Tage, wohingegen die Zellen der OAW42-B8⁻ Zelllinie sich bereits alle 2-3 Tage verdoppeln.

Die in dieser Arbeit verwendeten transfizierten Zellen der Zelllinie OAW42-B8⁻ und OAW42-H8⁺ wurden zuvor schon in der Arbeitsgruppe Reinartz (Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Marburg) generiert und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Generell gibt es eine Vielzahl von Methoden eine Transfektion durchzuführen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Zellen, wurde die Lipofektion gewählt. Das dabei verwendete Lipofectamine ist ein oft benutztes Transfektionsreagenz, das die Effektivität der Transfektion eines RNA-Plasmids in in vitro Zellen erhöhen soll. Der Vorgang wird dann als Lipofektion bezeichnet. Der Plasmid wird bei dieser Methode in Liposomen per Endozytose durch die Zellmembran geschleust. Die Genforschung macht sich Plasmide als Transportvehikel für DNA-Moleküle als eine effektive Transfektionsmethode zu Nutze. In der vorliegenden Arbeit wurden 5 individuelle SureSilencing shRNA Plasmide der Firma SABioscience benutzt, von denen jeweils 4 theoretisch einen spezifischen Knockdown für das CA125 Protein

erzielen sollten. Sie unterscheiden sich in ihren Insertionssequenzen. Ein fünfter Plasmid wies eine unspezifische Sequenz auf, bei dem die CA125 Expression nicht beeinträchtigt wurde und bot somit den spezifischen Plasmiden gegenüber eine Kontrolle. Um die stabil transfizierten Zellen später von den vektorfreien Zellen zu selektieren, enthalten die Plasmide einen Selektionsmarker, in diesem Fall ein Resistenzgen gegen Neomycin.

Folgende Tabelle soll einen Überblick über die Bezeichnung der Klone sowie deren CA125 Expression geben.

Zelllinie	Klon	CA125 Expression
<i>OAW42-B8⁻</i>	OAWB8 ⁻ NC	+
<i>OAW42-B8⁻</i>	OAWB8 ⁻ 125 ⁻	-
<i>OAW42-H8⁺</i>	OAWH8 ⁺ NC	+++
<i>OAW42-H8⁺</i>	OAWH8 ⁺ 125 ⁻	-

Tabelle 2: Überblick über die Klone der Zelllinien OAWB8⁻ und OAWH8⁺ und deren CA125 Expression.

Der Übersichtlichkeit halber, werden die Zelllinien im Text mit OAWB8⁻ und OAWH8⁺ abgekürzt.

3.1.2 Passagieren und Aussäen von Zellen

Kulturmedium RPMI/10% FCS für OAW42-H8⁺ und OAW42-B8⁻ (100ml, steril):

88 ml RPMI 1640 with Phenol Red, with Glutamin

10 ml FCS (steril)

1 ml Natrium-Pyruvat (100mM)

1 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

Trypsin-EDTA-Lösung (37°C) zur Lösung der adhärennten Zellen

Trypanblau-Lösung zum Anfärben der Zellen:

0,25 g Trypan Blue Powder

Ad 50ml Dulbecco's PBS

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilbank, die sowohl vor als auch nach Benutzung mit 70%igem Ethanol desinfiziert wurde. Alle Laborutensilien unter der Sterilbank wurden vor Gebrauch ebenfalls mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Behältnisse sowie Kulturflaschen, Tubes oder Falcons wurden vor Gebrauch unter der Sterilbank jeweils vor und nach dem Öffnen kurz mit dem Bunsenbrenner abgeflemt, um die Kontaminationsgefahr so gering wie möglich zu halten.

Die Kulturmedien wurden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Schüttelwasserbad bei 37 °C erwärmt, um den Temperaturunterschied der Zellen so gering wie möglich zu halten.

Die Zellen der Linie OAW42 wurden in RPMI-Medium 10 % FCS in Kulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96-98 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die Zelldichte betrug pro Kulturflasche ca. $2,7 \times 10^4$ Zellen/cm². Bei einer mittleren Kulturflasche wurde daher eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen in 20 ml Kulturmedium umgesetzt.

Um das Risiko von Mutationen gering zu halten und die Expression von CA125 nicht zu beeinflussen, wurden die Zellen bereits bei einer Konfluenz zwischen 80 – 85 % geerntet und in eine neue Kulturflasche passagiert. Die Zellen wurden spätestens nach der zwölften Passage verworfen, um Mutationen zu vermeiden.

Die Lösung der adhärenenten Zellen vom Kulturflaschenboden wurde mittels Trypsin-EDTA (5 ml pro Flasche) erreicht. Das Kulturmedium in der Kulturflasche wurde dafür zuvor vollständig abgenommen. Für eine mittlere Flasche wurden nicht mehr als 5 ml Trypsin-EDTA benutzt, um die Zellen nicht zu schädigen. Der Zellrasen wurde durch leichtes Schwenken gleichmäßig mit der Trypsin-Lösung bedeckt und für 10 Minuten (maximal 15 Minuten) im Brutschrank bei 37 % inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde anschließend mit mindestens 5 ml FCS-haltigem Kulturmedium gestoppt.

Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren konnten vereinzelte, noch adhärenente Zellen vom Flaschenboden gelöst und eine homogene Zellsuspension erreicht werden.

Die Zellen wurden nachfolgend in ein steriles 50 ml-Falkon überführt und 10 Minuten zentrifugiert (260g, RT), sodass sich das Zellpellet am Grund des Falkons befand. Der Überstand an Medium und Trypsin wurde abpipettiert und die Zellen je nach Zellzahl in 1 oder 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellanzahl wurde anschließend mittels Trypanblau und Neubauer-Zählkammer erhoben. Hierfür wurde eine Probe der Zellsuspension mit Trypanblau in der Relation 1:10 verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der Vorteil der Trypanblaulösung besteht darin, dass nur die nicht intakten Zellmembranen von toten Zellen durchlässig für den blauen Farbstoff sind und somit intakte von nicht vitalen Zellen unterschieden werden können. Es wurden zur Bestimmung der Zellzahl nur die vitalen Zellen mitgezählt und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Vitale Zellen pro ml} = \frac{\text{ungefärbte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000}{\text{Anzahl der gezählten Eckquadrate}}$$

Anschließend wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in Zellkulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium passagiert und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Bei Farbumschlag des im RPMI Medium enthaltenen Indikators Phenolrot wurde die Hälfte des verbrauchten Mediums in der Kulturflasche verworfen und durch neues Medium ersetzt.

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieremedium (10 ml, steril):

9 ml FBS (Fetal Bovine Serum)

1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid)

Das Einfrieren von Zellen in Kryoröhrchen ermöglicht eine nahezu unbegrenzte Konservierung der Zellkulturen über einen längeren Zeitraum. Da das Einfrieren und Auftauen der Zellen jedoch ein sehr strapaziöser Vorgang für die Zellen ist, wird hier eine besondere Suspension benötigt, die die eingefrorenen Zellen unter anderem vor der Bildung von Eiskristallen schützt.

Die Zellen wurden wie im Kapitel zuvor beschrieben geerntet und gezählt. Die gewünschte Zellzahl wurde anschließend erneut zentrifugiert und der Überstand

an Medium anschließend komplett abgenommen. Die Zellen wurden nun tropfenweise mit eiskaltem Einfriermedium beschichtet, damit sie sich langsam an die Kälte gewöhnen konnten und eine Schädigung der Zellen möglichst ausblieb. Die Menge an Einfriermedium richtete sich nach der gewünschten Kryoanzahl. In ein Kryoröhrchen wurden ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium gegeben. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierdose gelagert und langsam ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) im Gefrierschrank auf -80°C abgekühlt. Nach frühestens 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in einem Flüssigstickstofftank überführt.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen, nachdem sie aus dem Stickstofftank geholt wurden, zunächst im warmen Wasserbad (37°C) angetaut und zur möglichen Mykoplasmandekontamination mit Methanol abgesprüht. Um die Zellen möglichst schonend aufzutauen, musste ab hier zügig gearbeitet werden. Die eiskalte Zellsuspension wurde aus dem Kryo in ein 50 ml Falcon überführt und tropfenweise mit kaltem Kulturmedium beschichtet. Nach 10 Minuten Zentrifugation (260g, RT) wurde der Überstand an Einfriermedium abgenommen, in frischem Kulturmedium resuspendiert und anschließend zur Kultivierung in Kulturflaschen passagiert (Passage 0).

3.1.4 Chemotherapeutikabehandlung und Proliferationsbestimmung mit Hilfe von MTT

MTT-Reagenz (10 ml):

50 mg MTT Powder

Ad 10 ml Dulbecco's PBS

Solubilisierungs-Reagenz (30 ml, steril filtriert):

3 g SDS

Ad 30 ml Aqua 0,01 M HCl

Kulturmedium (phenolrotfrei, steril) 100 ml:

88 ml RPMI 1640 without Phenol Red, with L-Glutamin

10 ml FCS

1 ml Natrium-Pyruvat (100 mM)

1 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

Zur Messung der Zellvitalität bzw. Zellviabilität im Vergleich zu einer Zellkontrollprobe wurde ein auf MTT basierender kolorimetrischer Test verwendet. Viliabilitätsnachweise mittels MTT basieren teilweise auf den mitochondrialen Eigenschaften sowie auf enzymatischen Eigenschaften des endoplasmatischen Retikulums von lebenden und proliferierenden Zellen. Das gelbe Tetrazoliumsalz in der MTT-Suspension reagiert in Abhängigkeit des Enzyms NADPH und NADH zu violetten Formazankristallen. Durch die Solubilisierungs-Reagenz werden die Kristalle anschließend wieder aufgelöst und die Extinktion anschließend im Photometer bei einer Referenzwelle von 690 nm objektiv erfasst. Die Zellen der jeweiligen Zellreihen wurden zunächst durch Trypsinierung geerntet, in phenolrotfreiem RPMI-Medium resuspendiert und gezählt.

Mithilfe dieses Versuchs sollen Konzentrations-Wirkungsplots der unterschiedlichen Zellpopulationen erstellt werden, die Rückschlüsse auf die jeweilige Chemosensitivität zulassen. Dazu wurden pro Bedingung zwei identische Ansätze erstellt, von denen jeweils einer am entsprechenden Tag der Chemotherapeutikazugabe (Tag 0) und einer an Tag 3 und 4 nach Chemotherapeutikazugabe vermessen wurde. Dadurch ließen sich Schwankungen in den ausplattierten Zellzahlen der unterschiedlichen Bedingungen durch Bildung der Zellverdopplungsrate (Ratio Absorptionswert Tag 3 bzw. Tag 4 / Tag 0) später ausgleichen.

Abhängig von der jeweiligen Zellreihe wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen in je 50 µl phenolrotfreiem Kulturmedium auf drei 96-Multi-Well Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe der Chemotherapeutika (Carboplatin, Paclitaxel einzeln und in Kombination) in Triplikaten auf ein Endvolumen von 100 µl pro Well. Hierbei wurden durch Verdünnungsreihen in phenolrotfreiem RPMI Medium für Carboplatin-Konzentrationen von 2,5 µM bis 40 µM eingestellt. Für Paclitaxel wurde als höchste Konzentration 25 nM und als niedrigste 0,4 nM zu den Zellen gegeben. Des Weiteren wurden die zwei Chemotherapeutika auch in Kombination zu den Zellen gegeben. In jeder Platte diente ein Triplikat als

Leerwert und erhielt keine Chemotherapeutikabehandlung. Die Messung von Tag 0 erfolgte dabei gleich nach Chemotherapeutikazugabe. Hierfür wurden pro Well 10 µl MTT-Reagenz hinzupipettiert. Die Zellen wurden im Brutschrank 4 Stunden inkubiert und anschließend mit 100 µl Solubilisierungs-Reagenz pro Well versehen. Die Auswertung mittels Photometer konnte erst nach maximal 24 Stunden erfolgen, da alle Kristalle vor Messungsbeginn aufgelöst sein mussten. Die Auswertung erfolgte mit *Multiskan Ascent 2.6*, *Microsoft Office Excel 2007* und *Graph Pad Prism 6.0.2*. Nach der Messung wurden die 96-Multi Well Platten verworfen. Die übrigen Ansätze inkubieren für 3 bzw. 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ bevor auch sie nach der gleichen Methode ausgemessen wurden.

3.1.5 Sphäroidkultur und Chemotherapeutikabehandlung

Um die Auswirkung von Sphäroidbildung hinsichtlich der Chemosensitivität im Vergleich zu den adhärenenten Zellen zu testen, wurde das gleiche Verfahren mittels MTT wie oben beschrieben unter Sphäroidkulturbedingungen wiederholt.

Hierfür wurden die Zellen in hoher Anzahl in mit Agarose beschichteten Petrischalen ausplattiert. So wurde die Adhärenz der Zellen am Plattenboden verhindert. Die frei im Medium schwimmenden Zellen konnten nun Zellaggregate, sogenannte Sphäroide bilden.

Für die Beschichtung der Petrischale wurde 1,0 % Agarose verwendet. Pro Petrischale wurden hierfür 12,5 mg Agarose eingewogen und in 12,5 ml PBS für 5 Minuten im Wasserbad aufgekocht. Anschließend wurde die Agarose auf ca. 50 °C abgekühlt und unter leichtem Schwenken in die Petrischale gegossen. Danach kühlte die geöffnete Platte ca. 30 Minuten unter der Sterilbank aus.

Pro beschichtete Petrischale wurden nach Abkühlen und Aushärten der Agarose 1 x 10⁶ Zellen in 15 ml Sphäroidmedium ausplattiert und für 6 Tage kultiviert. Alle 2 Tage erfolgte ein halber Mediumwechsel. Hierfür wurden 7 ml Medium aus der Petrischale in ein 50 ml Falcon überführt und für 10 Minuten bei 260 xg abzentrifugiert. Das alte Medium wurde anschließend abgenommen und die Zellen in 7 ml frischem Medium resuspendiert und wieder zurück in die Petrischale gegeben. Nach 6 Tagen wurden die Sphäroide geerntet und in 5 ml Trypsin (5 Minuten) durch Resuspendieren vereinzelt.

Die Zellen wurden anschließend ausgezählt und nach dem gleichen Protokoll wie oben beschrieben auf 96er-Well-Platten in phenolrotfreiem RPMI-Medium ausplattiert.

Anschließend wurden die gleichen Chemotherapeutikakonzentrationen wie im oben beschriebenen Versuch hinzugefügt. Die Messung von Tag 0 erfolgte gleich nach Chemotherapeutikazugabe. Zwei weitere Messungen erfolgten nach 3 und 4 weiteren Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.2 Durchflusszytometrische Analysen

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (engl.: fluorescence activated cell sorting, Abk.: FACS) besteht darin, dass Zellen einzeln in hohem Tempo durch eine Küvette hindurchgesaugt, von einem Laserstrahl erfasst und dadurch zur Emission von Licht in einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Der durch die Zelle hindurchtretende Laserstrahl erzeugt ein bestimmtes Streulicht, das eine präzise Aussage über Form, Volumen und Größe der jeweiligen Zelle geben kann, abhängig vom Winkel mit dem der Strahl auf die Zelle trifft.

Mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern kann so auch nach spezifischen Strukturen z.B. auf der Zellmembran gesucht werden. Die Zellen werden dazu vor der Messung mit entsprechenden Antikörpern markiert, die spezifisch an die gewünschte Struktur binden. Die vom Fluoreszenzfarbstoff erzeugten Emissionen des auf die Zelle auftreffenden Laserstrahls werden dann vom Zytometer erfasst.

3.2.1 Aldefluor

DEAB Reagent, 1,5 mM in 95 % Ethanol

Aldefluor Assay Buffer

Dry Aldefluor Reagent

Mit dem Aldefluor™ Assay (Aldefluor Kit, Stem Cell Technologies) kann die Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) innerhalb einer Zelle durchflusszytometrisch bestimmt werden. Dabei haben Stamm- und Tumorzellen eine besonders hohe Expressionsrate von ALDH und können so von Zellen mit niedriger ALDH-Aktivität unterschieden werden.

Aldefluor wird dabei in seiner ungeladenen Form als BodipyTM-Aminoacetaldehyde (BAAA) zu den Zellen gegeben. Durch passiven Transport diffundiert das Substrat in die Zelle, wo es spezifisch an die intrazelluläre Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH 1) bindet und so zu seinem Produkt BodipyTM-Aminoacetat (BAA) reduziert wird, das die Zelle aufgrund seiner negativen Ladung nun nicht mehr verlassen kann. Das Ausströmen des Reaktionsproduktes wird zusätzlich durch einen Efflux-Inhibitor im Färbepuffer verhindert.

Stamm- und Tumorzellen haben eine besonders hohe Expressionsrate von ALDH. Da die Menge des umgesetzten Substrats proportional zur Aktivität von ALDH ist, müsste sich das fluoreszierende BodipyTM-Aminoacetat (BAA) besonders in diesen Zellen anreichern. Die fluoreszierenden Zellen können dann mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen und ausgezählt werden.

Tote Zellen oder Zellen mit nicht intakter Membran können das negative Aldefluor-Reaktionsprodukt nicht speichern und werden vom Zytometer somit auch nicht detektiert.

Als Negativkontrolle dient der spezifische Inhibitor Diethylamonibenzaldehyd (DEAB) von ALDH, der im 25-fachen Überschuss verwendet wird.

Die Zellen wurden zunächst nach Standardprotokoll mit Trypsin EDTA geerntet und ausgezählt. Es wurden je 2×10^5 Zellen pro Zelllinie in Eppendorftubes gesetzt und anschließend 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand an Medium wurde abgenommen und die Zellen anschließend in je 1000 µl Aldefluor Assay Buffer resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl Aldefluor-Reagenz pro Tube in die Zellsuspension gegeben. Daraufhin wurden umgehend 500 µl der Probe (entsprechend 1×10^5 Zellen) als Negativkontrolle in ein neues Tube mit 5 µl DEAB überführt und ebenfalls resuspendiert.

Da das DEAB Reagenz in 95 % Ethanol vermischt ist, musste hier besonders schnell gearbeitet werden, damit die geringe Menge an Ethanol und DEAB-Reagenz nicht verdunstet.

Die Tubes wurden anschließend 40 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 260 g für 5 Minuten zentrifugiert und in je 500 µl neuem AldefluorTM Puffer, der vorher auf Eis gekühlt wurde, resuspendiert. Die Zellen wurden nun in FACs-Röhrchen überführt und nochmal 5 Minuten abzentrifugiert. Der AldefluorTM Puffer wurde nachfolgend bis auf ca. 100 µl

abgenommen und die Messung mit Hilfe des *FACS Calibur* und entsprechender *Cell Quest Pro Software* sofort angeschlossen. Bis zur Ausmessung wurden die FACS-Röhrchen auf Eis gelagert, um den Efflux des Farbstoffes aus den Zellen zu minimieren.

Es wurden ca. 20 000 vitale Zellen pro Messung aquiriert. Für die Berechnung des tatsächlichen Anteils eines Markers wurde der Prozentsatz der Kontrollmessung von der jeweiligen Probe wie folgt abgezogen: der prozentuale Anteil der ALDH⁺ Zellen ergibt sich aus dem prozentualen Anteil von Zellen im Gate ALDH⁺ der Testprobe weniger dem prozentualen Anteil der Zellen im Gate ALDH⁺ in der DEAB Kontrolle.

3.2.2 Nachweis von CA125 auf der Zelloberfläche

Cellwash / 5 % FCS

1 L Aqua dest

2 Tabletten PBS Tablets

53 ml FCS

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach Standardprotokoll mit Trypsin geerntet und ausgezählt. Anschließend wurden je 1×10^5 Zellen pro Zelllinie in FACS-Röhrchen überführt. Um die Zellen vom farbigen Phenolrot, dass sich im Kulturmedium befindet zu reinigen, wurde nach 5-minütiger Zentrifugation (260 xg) der Überstand an Kulturmedium abgenommen und die Zellen in 2 ml Cellwash/5 %FCS resuspendiert. Der Waschvorgang wurde anschließend wiederholt und der Überstand an Cellwash/5 %FCS bis auf ca. 100 µl abgenommen.

Zur Zelloberflächenmarkierung von CA125 wurden die Zellen mit 50 µl des monoklonalen Maus Anti-MUC16 (x75) Primärantikörpers (1 µg/ml) für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Für die Isotypenkontrolle wurden 1×10^5 Zellen pro Zellreihe in einem separaten Tube mit je 50 µl Maus IgG (1 µg/ml) versehen und ebenfalls für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert.

Nach einer Stunde wurden alle Proben aus dem Kühlschrank genommen, 5 Minuten zentrifugiert und abermals in je 1 ml Cellwash/5 %FCS resuspendiert. Die Waschung wurde daraufhin wiederholt, um nicht-gebundene Antikörper, die

störende Hintergrundemission verursachen könnten, so gut es geht zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit FITC-markiertem Sekundärantikörper. Der Antikörper wurde hierfür zunächst in einer 1:10 Mischung verdünnt und anschließend je 5 µl der Verdünnung zu den Zellen gegeben. Der fluoreszierende Antikörper wird nun spezifisch an den Fc-Teil der monoklonalen Maus Anti-MUC16 Primärantikörper binden, nicht aber an die der Isotypenkontrolle. Nach 30 Minuten Inkubation im Kühlschrank wurden die Zellen erneut mit Cellwash/5 %FCS gereinigt und anschließend mithilfe des *FACS Calibur* und entsprechender *Cell Quest Pro Software* gemessen.

Mit Hilfe eines Dot-Plot der Isotypkontrolle, bei dem Forwardscatter (FSC) und Sidescatter (SSC) aufgetragen werden, konnten Zelltrümmer ausgegattet werden (Gate R3). Auf Kanal 3 wurde weiterhin die FITC Fluoreszenz und auf Kanal 4 die PI-Floureszenz registriert. Damit konnte ein zweites Gate um die PI-negativen Zellen gesetzt werden (Gate R1). Vitale Zellen wurden definiert als Zellen, die von beiden Gates R1 und R3 eingeschlossen wurden. Die Auswertung mit Hilfe der CellQuest Pro Software erfolgte anschließend anhand eines logarithmischen histogramm-Plots. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit Hilfe der Isotypkontrolle auf maximal 5 % gesetzt. Die relative Zahl der CA125-exprimierenden Zellen an allen vitalen Zellen ergab sich folglich abzüglich der 5 % Hintergrund- und Eigenemission der jeweiligen Isotypkontrolle.

3.2.3 Anfärbung von verschiedenen Tumorstammzellmarker auf der Zelloberfläche

Staining buffer TAM Pheno 1 % FCS

Humane Antikörper:

CD44-FITC human 1 mL

CD24-PE human 1 mL

CD117-PE human 1 mL

CD133/2 (293C3)-APC human 1 mL

Mausantikörper:

Mouse IgG2a-APC 1 mL

Mouse IgG1-FITC 1 mL

Mouse IgG2a-PE, Isotype Control

Das CD24 Antigen sowie CD44, CD117 und CD133 sind Glycoproteine auf der Zelloberfläche, die besonders bei Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften vorzufinden sind und die das Verhalten der Zelle gegenüber Zell-Zellkontakten, Zelladhäsion und Migration beeinflussen.

Die Zellen wurden zunächst nach Standardprotokoll mit Trypsin geerntet und ausgezählt. Je 3 Mal 1×10^5 Zellen pro Zelllinie wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml Staining Buffer und anschließender Zentrifugation (260 xg, 5 Minuten) gereinigt. 1×10^5 Zellen pro Zelllinie wurden nun mit 1 μ l CD24-PE, 1 μ l CD133-APC und 1 μ l CD44-FITC versehen. Da es sich bei CD24 und CD117 um die gleiche Färbung handelt, wurden in einem separaten FACS-Röhrchen 1×10^5 Zellen mit 1 μ l CD117-PE versehen. Dabei handelt es sich um 4 humane Antikörper, die an die jeweiligen Oberflächenproteine binden und sie somit markieren. Die verbleibenden 1×10^5 Zellen pro Zelllinie, wurden mit je 1 μ l Isotyp Maus FITC, 1 μ l Isotyp Maus APC und Isotyp Maus PE versehen und galten somit als Isotypkontrolle. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank, einer Waschung mit 1 ml Staining Buffer und Abnahme des Überstandes auf 100 μ l, konnten die Zellen anschließend mithilfe des *FACS Calibur* und entsprechender *Cell Quest Pro Software* gemessen werden. Die unspezifische Färbung der Isotypkontrolle wurde dabei jeweils abgezogen.

3.3 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Funktionen Mittelwert und Standardabweichung von Microsoft Excel verwendet. Die Signifikanzberechnungen zwischen verschiedenen CA125 Knockdownklonen und der CA125⁺ Kontrolle erfolgten durch Anwendung eines t-Tests für unverbundene Stichproben. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant betrachtet. Die IC₅₀ wurde

nach dem Boltzmann Model von Dr. Gerard Verschuuren errechnet. Diese setzt sich folgendermaßen zusammen:

$$y = \min + (\max - \min) / (1 + \exp((EC50x)/slope))$$

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CA125 auf die Expression von Tumorstammzellmarkern, die Chemoresistenz sowie die Sphäroidbildung von Ovarialkarzinomzellen untersucht. Dazu wurden die Zelllinie OAW42-H8⁺, in der CA125 stark exprimiert wird, sowie die Zelllinie OAW42-B8⁻, in der CA125 nur schwach exprimiert wird, verwendet. Für beide Zelllinien wurde bereits im Rahmen einer zuvor durchgeführten Arbeit ein Knockdown von CA125 mittels stabiler shRNA Transfektion erreicht. Dabei wurde ein CA125 shRNA tragender Plasmid sowie ein Kontrollplasmid transfiziert. Die Bedeutung von CA125 im Ovarialkarzinom wurde durch den Vergleich der stabilen CA125 negativen Knockdownklone (CA125⁻) mit der jeweiligen CA125⁺ Kontrolle (NC) analysiert.

4.1 Quantifizierung des CA125 Knockdowns auf mRNA- und Proteinebene

4.1.1 Kontrolle des CA125 Knockdowns auf mRNA Ebene

In der Arbeitsgruppe Reinartz wurde die Expression von CA125 für die transfizierten Zelllinien OAWH8⁺ sowie OAWB8⁻ bereits auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Expression von CA125 im Klon OAWH8⁺ CA125⁻ beträgt nur noch 9,9 %. Der Knockdown liegt damit bei 90,1 % und ist somit erfolgreich. Der Knockdown im Klon OAWB8⁻ CA125 liegt bei 93,81 % und ist somit ebenfalls erfolgreich.

4.1.2 Nachweis der CA125 Oberflächenexpression

Die Bestimmung der CA125 Oberflächenexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Expression von CA125 im Klon OAWH8⁺ CA125⁻ beträgt nur noch 10 % (Abbildung 1). Der Knockdown liegt damit bei 90 % und ist auch auf Proteinebene signifikant. Die Expression von CA125 im Klon OAWB8⁻ CA125⁻ beträgt nur noch 0,45 % wobei die Expression von CA125 im NC Klon nur bei 7,4 % liegt (Abbildung 2). Nach Transfektion mit dem shRNA-Plasmid kann hier ein Knockdown von 93 % erreicht werden.

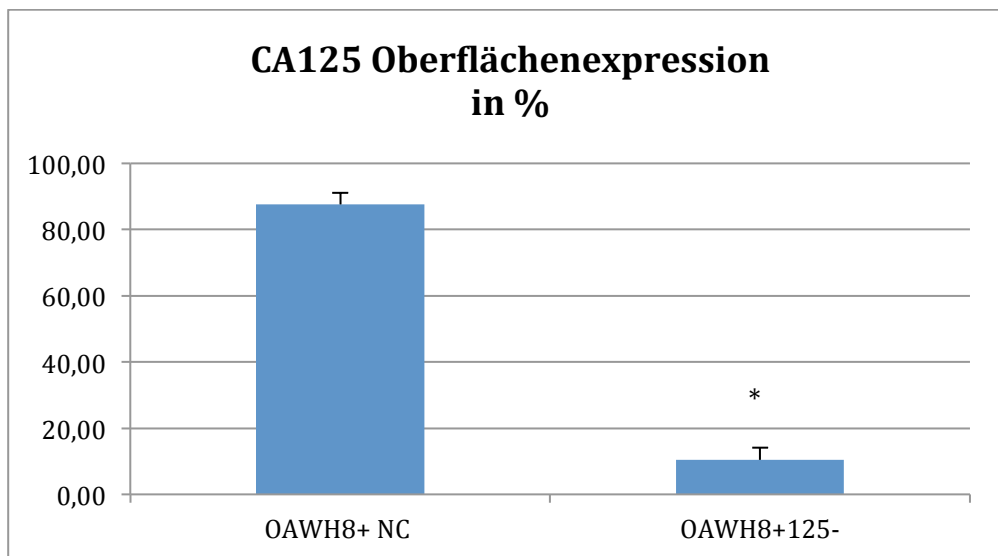


Abbildung 1: Reduktion der oberflächlichen CA125 Proteinexpression in stabilen OAWH8+ Knockdown Zellen. Darstellung des Anteils der Zellen mit CA125 Expression abzüglich der unspezifischen Färbung der Isotypkontrolle an allen vitalen Zellen. * $p < 0,05$

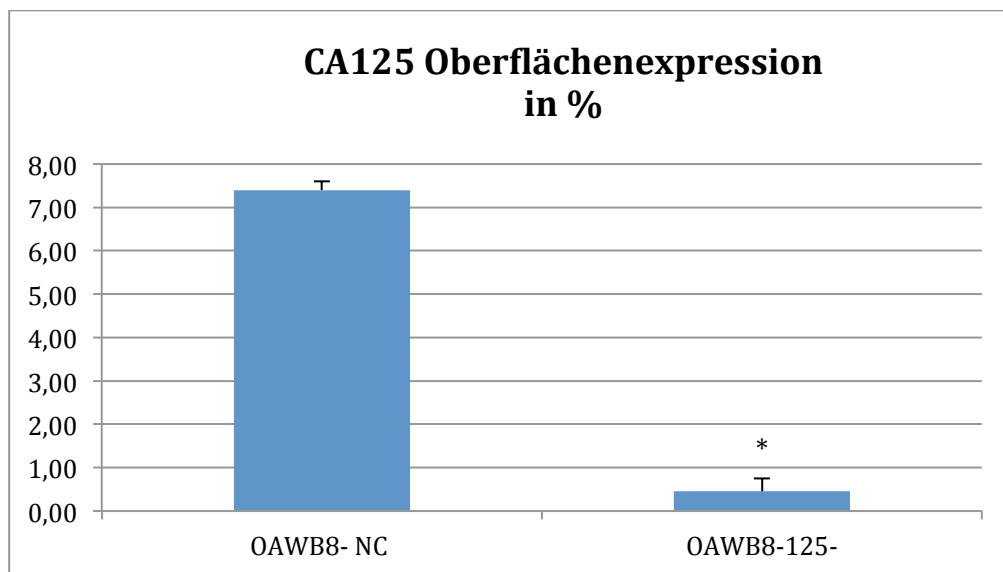


Abbildung 2: Reduktion der oberflächlichen CA125 Proteinexpression in stabilen OAWB8- Knockdown Zellen. Darstellung des Anteils der Zellen mit CA125 Expression abzüglich der unspezifischen Färbung der Isotypkontrolle an allen vitalen Zellen. * $p < 0,05$

Um zu gewährleisten, dass die Tumormarkerexpression der Zellen konstant bleibt, wurde die CA125 Oberflächenexpression regelmäßig kontrolliert.

4.2 Expression von Tumorstammzellmarkern

Die Glycoproteine CD24, CD44, CD117 und CD133 werden auf der Zelloberfläche exprimiert und sind insbesondere bei Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften vorzufinden (Tumorstammzellmarker). Aufgrund ihrer Lokalisation beeinflussen sie den Zell-Zellkontakt, die Zelladhäsion und die Zellmigration und somit auch die Tumorgenität. Des Weiteren wurde die Expression des Enzyms Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) untersucht, dessen erhöhte Expression bereits in anderen soliden Tumoren beschrieben ist (Silva et al., 2011). Das Ziel dieses Versuches ist es, den Einfluss von CA125 auf die Expression der Tumorstammzellmarker mittels Durchflusszytometrie zu analysieren.

4.2.1 Tumormarker CD24, CD44, CD133 und CD117 in der Zelllinie OAWB8⁻

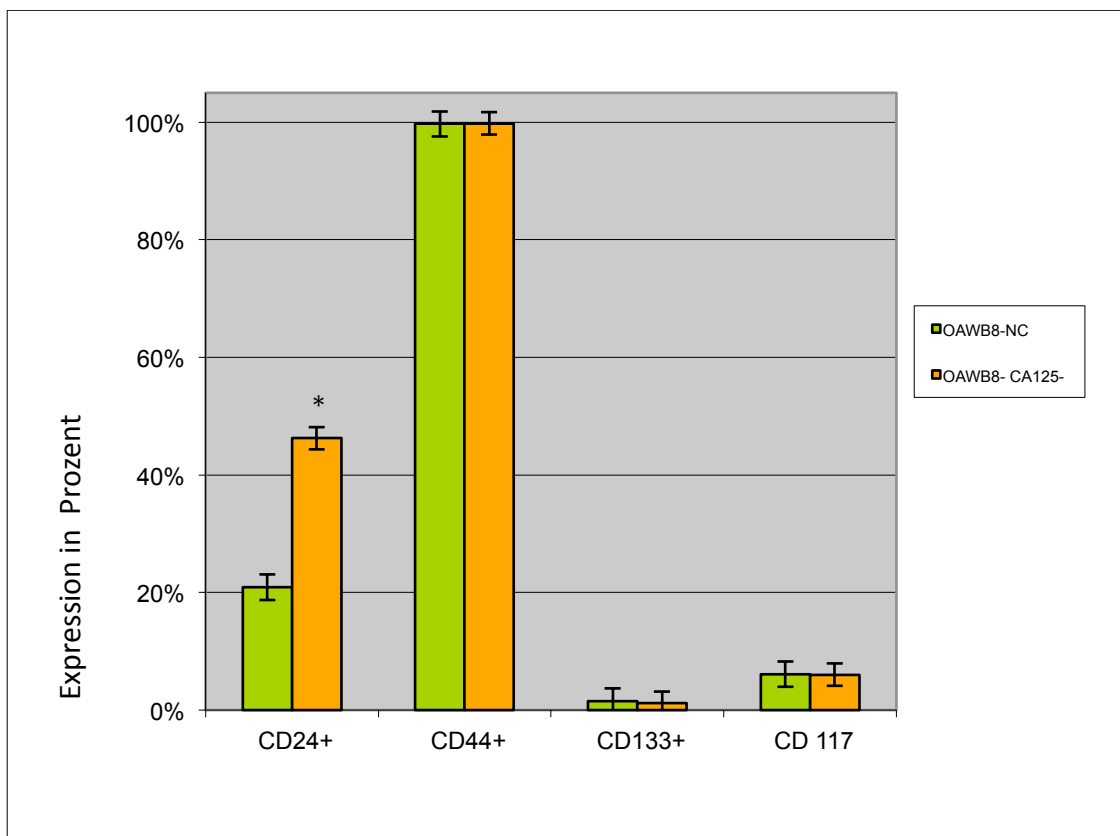


Abbildung 3: Oberflächliche Expression der Tumorstammzellmarker CD24, CD44, CD133 und CD117 im Vergleich zwischen CA125⁻ Knockdownzellen und der CA125⁺ Kontrolle in der Zelllinie OAWB8⁻.
* p<0,05.

Bei der Messung der CD133 Oberflächenexpression liegt die Markerdetektion sowohl beim OAWB8⁻ NC als auch beim OAWB8⁻ CA125⁻ Klon bei 1,5 % bzw. 1,3 %

(Abbildung 3). Die Oberflächenexpression von CD117 ergibt zwischen dem OAWB8⁻ NC und dem OAW B8⁻ CA125⁻ Klon ebenfalls keinen Unterschied. Sie liegt für beide Klone bei 6 % (Abbildung 3). Der Tumormarker CD44 zeigt bei beiden Klonen eine hohe Expressionsrate von 100 % (Abbildung 3). Hingegen wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der CD24 Oberflächenexpression zwischen den beiden Klonen gemessen. Für den OAWB8⁻ NC Klon ergibt sich eine CD24-Expression von 21 %, während bei dem CA125⁻ Knockdownklon eine Expression von 46 % gemessen wurde (Abbildung 3).

4.2.2 Tumormarker CD24, CD44 und CD133 in der Zelllinie OAWH8⁺

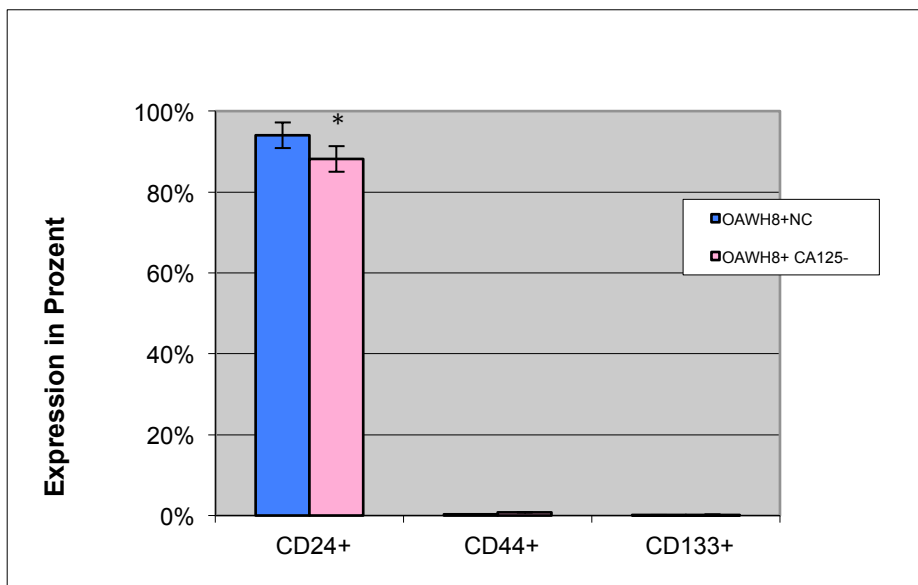


Abbildung 4: Oberflächliche Expression der Tumorstammzellmarker CD24, CD44 und CD133 im Vergleich zwischen CA125⁻ Knockdownzellen und der CA125⁺ Kontrolle in der Zelllinie OAWH8⁺ mittels Durchflusszytometrie. * $p < 0,035$.

Bei der Messung von CD44 und CD133 liegt die Markerdetektion sowohl für den OAWH8⁺ NC Klon als auch für den OAWH8⁺ CA125⁻ Klon jeweils bei unter 1 % (Abbildung 4). Für die Expression des Markers CD24 wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,035$) zwischen dem OAWH8⁺ NC Klon (94 %) und dem CA125⁻ Knockdownklon (88 %) gemessen (Abbildung 4). Bei dem OAWH8⁺ NC Klon zeigt sich damit eine um 6 % höhere Expression des Tumorstammzellmarkers (Abbildung 4). Die Markerexpression von CD117 war für beide Klone so gering, dass sie hier nicht abgebildet ist.

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse beider Zelllinien

Zusammenfassend wurde eine vielfach höhere Expression von CD44 in der Zelllinie OAWB8⁻ (100 % bei beiden OAW B8⁻ Klonen) als in der Zelllinie OAWH8⁺ (unter 1% bei beiden OAWH8⁺ Klonen) detektiert , jedoch kein Unterschied zwischen den NC Klonen und den CA125⁻ Knockdownklonen einer Zelllinie. Anders sieht dies für den Marker CD24 aus: in der stark CA125 positiven Zelllinie OAWH8⁺ ist die Markerexpression in beiden Klonen um ein Vielfaches höher (88 % im CA125⁻ Knockdownklon bzw. 94 % im NC Klon) verglichen mit der weniger stark CA125⁻ exprimierenden Zelllinie OAWB8⁻ (21 % im CA125⁻ Knockdownklon bzw. 46 % im NC Klon). Die nachfolgende Tabelle soll einen Überblick der Tumorstammzellmarkerexpression in beiden Zelllinien geben.

	OAWB8 ⁻ NC	OAWB8 ⁻ CA125 ⁻	OAWH8 ⁺ NC	OAWH8 ⁺ CA125 ⁻
CD44	99,71%	99,79%	0,28%	0,83%
CD24	20,87	46,26%	94,03%	88,19%
CD133	1,52%	1,24%	0,1%	0,72%
CD117	6,14%	6,02%		

Tabelle 3: Überblick der Expression der Tumorstammzellmarker CD24, CD44,CD113 und CD117 in den Zelllinien OAWB8⁻ und OAWH8⁺.

4.2.4 Messung der Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität in der Zelllinie OAWB8⁻

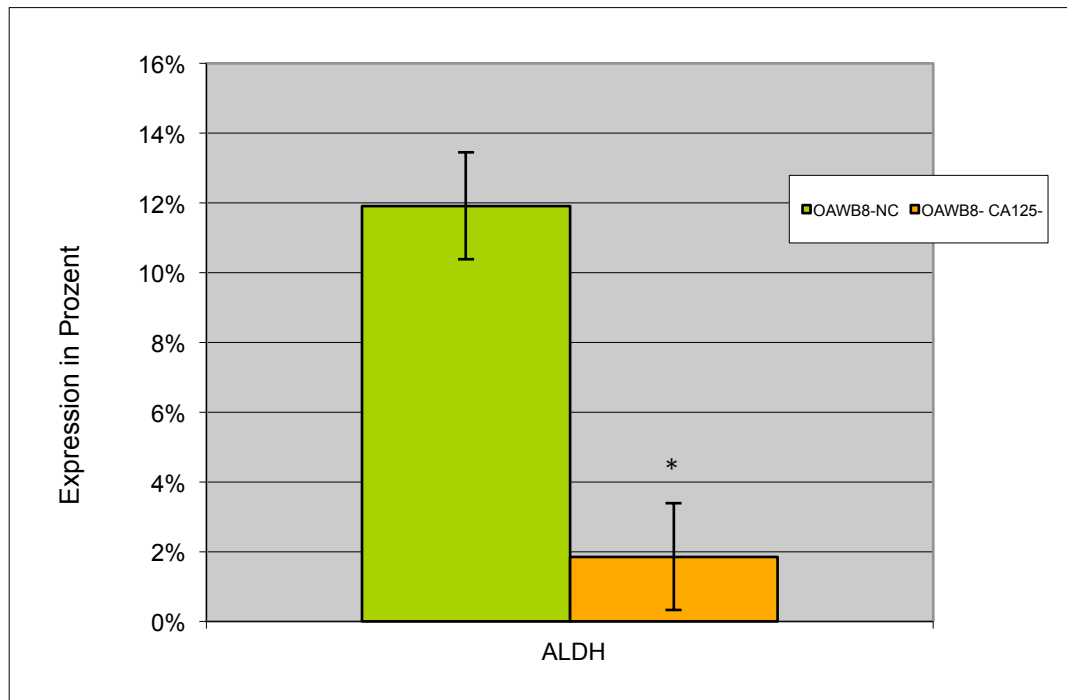


Abbildung 5: Messung der ALDH Aktivität im Vergleich von CA125⁻ Knockdownzellen und CA125⁺ Kontrolle in der Zelllinie OAWB8⁻ mittels Durchflusszytometrie * $p < 0,02$.

Für den OAWB8⁻ CA125⁻ Klon wurde im Rahmen dieses Versuches eine signifikant abgeschwächte Expression ($p < 0,02$) von ALDH gegenüber dem OAWB8⁻ NC Klon beobachtet. Während für den NC Klon eine Expressionsrate von 12 % gemessen wurde, sind es für den CA125⁻ Knockdownklon nur 2 %.

4.2.5 Messung der Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität in der Zelllinie OAWH8⁺

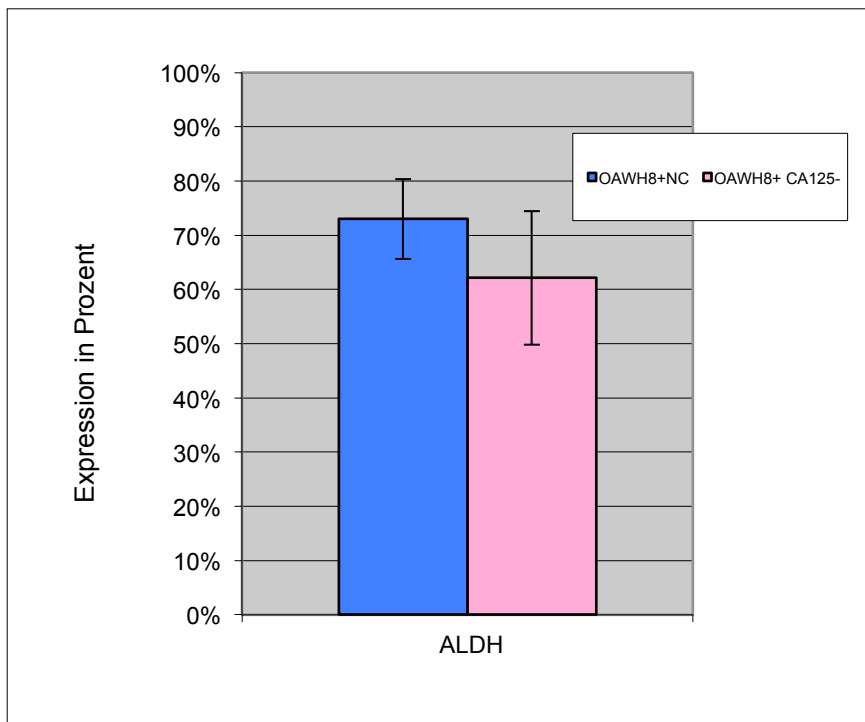


Abbildung 6: Messung der ALDH Aktivität im Vergleich von CA125⁻ Knockdownzellen und CA125⁺ Kontrolle in der Zelllinie OAWH8⁺ mittels Durchflusszytometrie.

Für die Zelllinie OAWH8⁺ wurde für den CA125⁻ Knockdownklon eine abgeschwächte Aktivität der ALDH (62 %) gegenüber dem NC Klon (73 %) gemessen (Abbildung 6). Der Unterschied zwischen den Klonen ist jedoch nicht signifikant ($p=0,1$).

4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse beider Zelllinien

Zusammenfassend kann man für die weniger stark CA125 exprimierende Zelllinie OAWB8⁻ im Vergleich zu der stark CA125-exprimierenden Zelllinie OAWH8⁺ in Bezug auf die ALDH-Expression folgende Aussage machen: die Zelllinie OAWH8⁺ exprimiert deutlich mehr ALDH (Abbildung 6) als die Zelllinie OAWB8⁻ (Abbildung 5). Für beide Zelllinien gilt, dass der CA125⁻ Knockdownklon weniger ALDH exprimiert als der NC Klon. Dies ist allerdings nur für die Zelllinie OAWB8⁻ signifikant. Die nachfolgende Tabelle soll einen Überblick der ALDH-Expression in beiden Zelllinien geben.

	OAWB8 ⁻ NC	OAWB8 ⁻ CA125 ⁻	OAWH8 ⁺ NC	OAWH8 ⁺ CA125 ⁻
ALDH	11,91%	1,86%	72,98%	62,12%

Tabelle 4: Überblick der ALDH-Expression in den Zelllinien OAWB8⁻ und OAWH8⁺.

4.3 Einfluss von CA125 auf die Chemosensitivität von Ovarialkarzinomzellen

Die aktuelle Behandlung fortgeschrittener Karzinome mit Chemotherapie erzielt oft keinen oder zumindest nicht den gewünschten Erfolg. Die Standardchemotherapie zur Behandlung des Ovarialkarzinoms basiert bisher hauptsächlich auf einer Kombination der Chemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel (Covens et al., 2002). Ziel der Versuche in dieser Arbeit ist es, den Einfluss von CA125 auf die Chemoresistenz von Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen.

Für die Versuche wurden unterschiedliche Konzentrationen von Carboplatin (0 - 40 μ M) und Paclitaxel (0 - 25 nM) als Monotherapie sowie in Kombination verwendet, Letzteres um einen möglichen Synergie-Effekt aufzuzeigen. Zur besseren Veranschaulichung und zur genaueren Errechnung der IC₅₀ (mittlere inhibitorische Konzentration) ist die Chemokonzentration in den Graphen im Logarithmus zur Basis e in der Einheit Mol angegeben. Die Proliferation der Zellen wurde nach 3- und 4-tägiger Kultur mit den Chemotherapeutika mittels MTT-Assay ermittelt. Da die Analyse der Zellen am 4. Tag keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem 3. Tag ergab, wird in den folgenden Versuchen lediglich auf den Tag 3 eingegangen.

4.3.1 Chemosensitivität in der Zelllinie OAWB8⁻

Carboplatin-Monotherapie

Carboplatin-Monotherapie

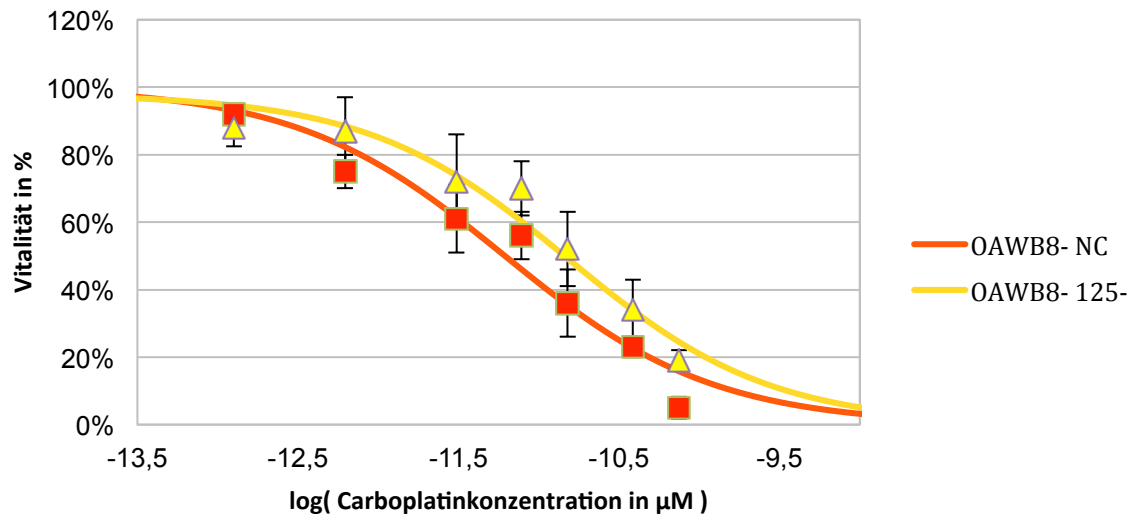


Abbildung 7: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁻ Knockdownzellen im Vergleich zu CA125⁺ Kontrollzellen mittels MTT in der Zelllinie OAWB8⁻. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte nach Monolayerkultur unter Verwendung unterschiedlicher Carboplatinkonzentrationen.

Die Zellvitalität der OAWB8⁻ NC Zellen sinkt bei Zugabe des Chemotherapeutikums schneller und stärker im Vergleich zu der der OAWB8⁻ CA125⁻ Knockdownzellen, die eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum zeigen (Abbildung 7). Dementsprechend wird die IC₅₀ der OAWB8⁻ NC Zellen bei 13,5 µM Carboplatin erreicht, die der CA125⁻ Knockdownzellen hingegen erst bei 20,1 µM Carboplatin.

Paclitaxel-Monotherapie

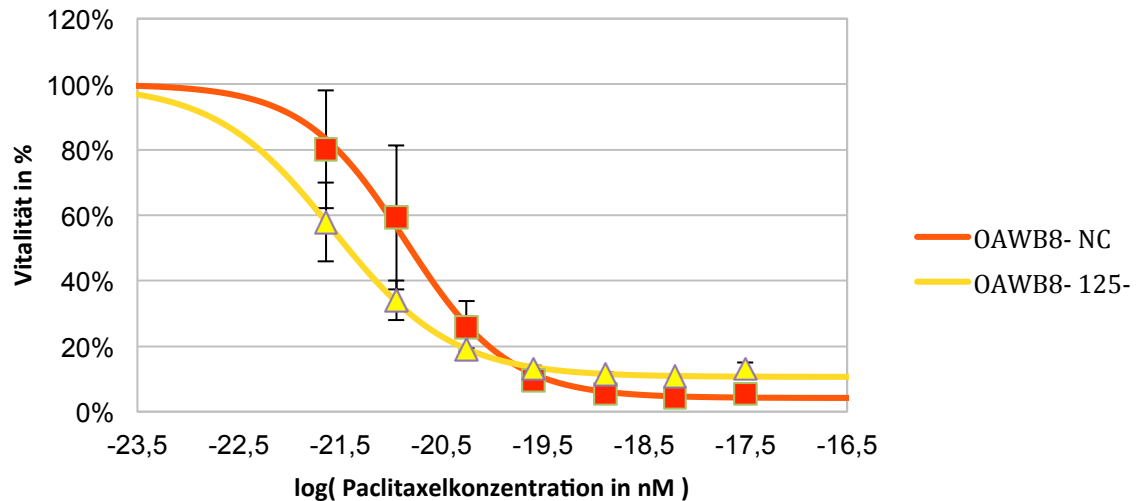


Abbildung 8: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125- Knockdownzellen im Vergleich zu CA125+ Kontrollzellen mittels MTT in der Zelllinie OAWB8. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte nach Monolayerkultur unter Verwendung unterschiedlicher Paclitaxelkonzentrationen.

Die OAWB8- NC Zellen reagieren zunächst resistenter auf die Zugabe des Chemotherapeutikums Paclitaxel als der CA125- Knockdownklon (Abbildung 8). Dementsprechend liegt die IC₅₀ für den OAWB8- NC Klon bei 0,8 nM Paclitaxel, während der OAWB8- CA125- Knockdownklon mit einer IC₅₀ von bereits 0,4 nM Paclitaxel zunächst deutlich sensibler gegenüber dem Chemotherapeutikum ist. Ab einer Konzentration von 3 nM Paclitaxel liegt die Zellvitalität des CA125- Knockdownklons jedoch signifikant über der der OAWB8- NC Zellen. Zusammenfassend reagiert der CA125- Knockdownklon sensibler auf geringe Konzentrationen von Paclitaxel als der OAWB8- NC, ist jedoch ab höheren Konzentrationen von Paclitaxel (≥ 3 nM) resistenter gegenüber dem Chemotherapeutikum.

Carboplatin und Paclitaxel Kombinationstherapie

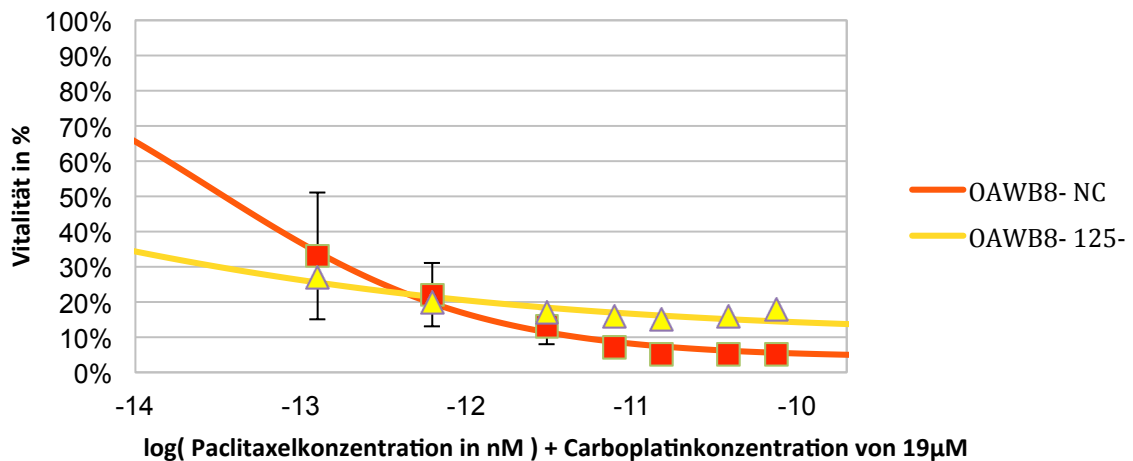


Abbildung 9: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁻ Knockdownzellen im Vergleich zu CA125⁺ Kontrollzellen mittels MTT in der Zelllinie OAWB8⁻. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte nach Monolayerkultur unter Verwendung einer festen Carboplatinkonzentration (19µM) und unterschiedlichen Paclitaxelkonzentrationen.

In der Kombinationstherapie wurde der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von Paclitaxel zusammen mit 19 µM Carboplatin (in vorherigen Versuchen ermittelte IC₅₀ für die OAWB8⁻ CA125⁻ Zellen) auf den CA125⁻ Knockdownklon gegenüber dem NC Klon untersucht.

Bei Zugabe von 19 µM Carboplatin und 0,4 nM Paclitaxel nimmt die Zellvitalität bei beiden Klonen schlagartig ab und liegt bei ~ 30 % (Abbildung 9). Bei weiterer Erhöhung der Paclitaxelkonzentration zeigt sich eine höhere Vitalität des CA125⁻ Knockdownklons im Vergleich zum OAWB8⁻ NC, wie es auch bei hohen Konzentrationen von Paclitaxel als Monotherapie beobachtet wurde (Abbildung 8).

Zusammenfassend zeigen beide Klone eine starke Sensitivität auf Paclitaxel in Kombination mit Carboplatin. Im Vergleich der beiden Klone zeigt sich der CA125⁻ Knockdownklon besonders bei geringen Konzentrationen Paclitaxel als deutlich sensativer. Die Kurve fällt hier steil ab. Dementsprechend ergibt sich eine IC₅₀ für den CA125⁻ Knockdownklon bei 0,012 nM gegenüber 0,13 nM bei seiner CA125⁺ Kontrolle.

4.3.2 Chemosensitivität in der Zelllinie OAWH8⁺

Carboplatin-Monotherapie

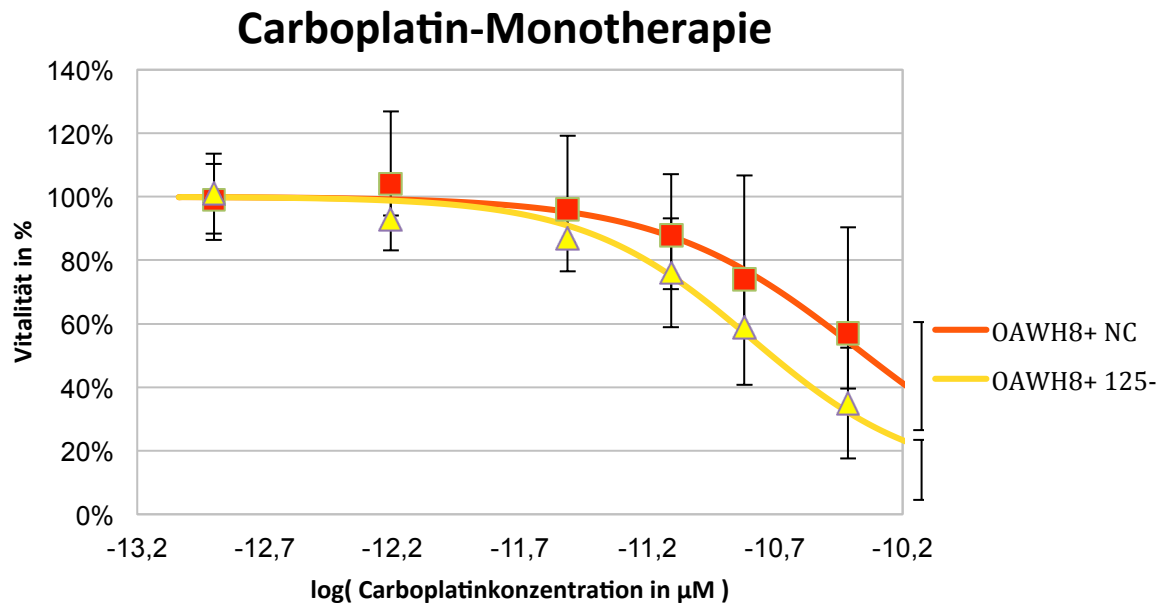


Abbildung 10: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁻ Knockdownzellen im Vergleich zu CA125⁺ Kontrollzellen mittels MTT in der Zelllinie OAWH8⁺. Die Chemosensitivität erfolgte nach Monolayerkultur unter Verwendung unterschiedlicher Carboplatinkonzentrationen.

Während die IC₅₀ des OAWH8⁺ NC Klons bei 31 µM Carboplatin erreicht ist, konnte bei den OAWH8⁺ CA125⁻ Knockdownzellen die IC₅₀ bereits bei 20 µM erzielt werden (Abbildung 10). Somit zeigt sich eine signifikant (p=0,01) verminderte Carboplatinresistenz der CA125⁻ Knockdown Zellen gegenüber dem OAWH8⁺ NC Klon.

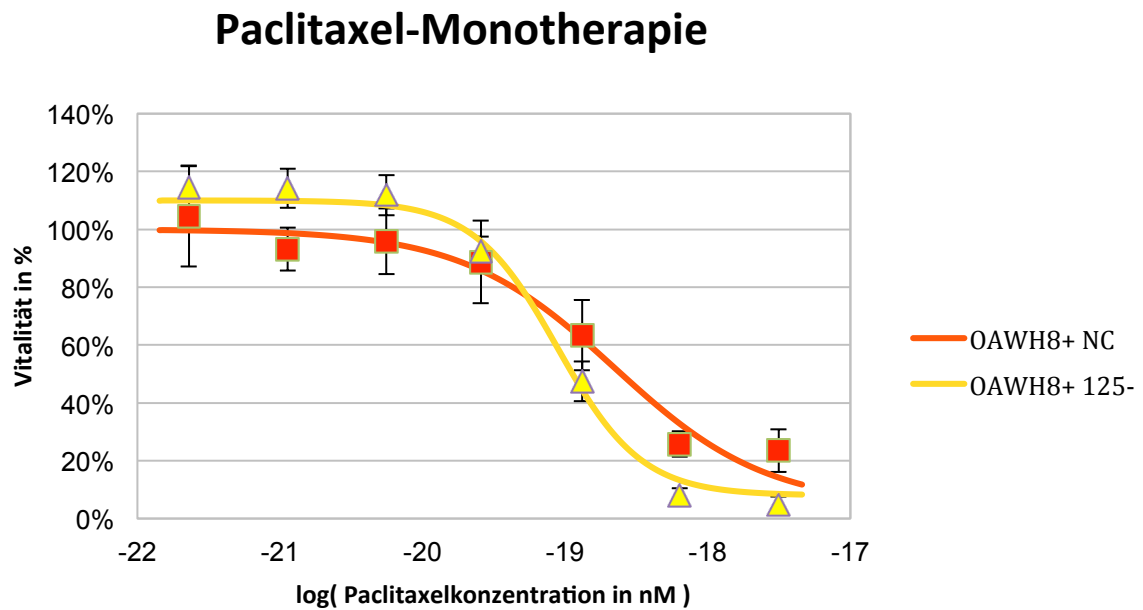


Abbildung 11: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁻ Knockdownzellen im Vergleich zu CA125⁺ Kontrollzellen mittels MTT in der Zelllinie OAWH8⁺. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte nach Monolayerkultur unter Verwendung unterschiedlicher Paclitaxelkonzentrationen.

Die Paclitaxel-Monotherapie ergab keinen signifikanten Unterschied in der IC₅₀ für die CA125⁻ Knockdownzellen gegenüber den OAWH8⁺ NC Zellen (Abbildung 11). Während die IC₅₀ der OAWH8⁺ NC Zellen bei 7,9 nM Paclitaxel erreicht wird, beträgt sie bei den CA125⁻ Knockdownzellen 5,3 nM.

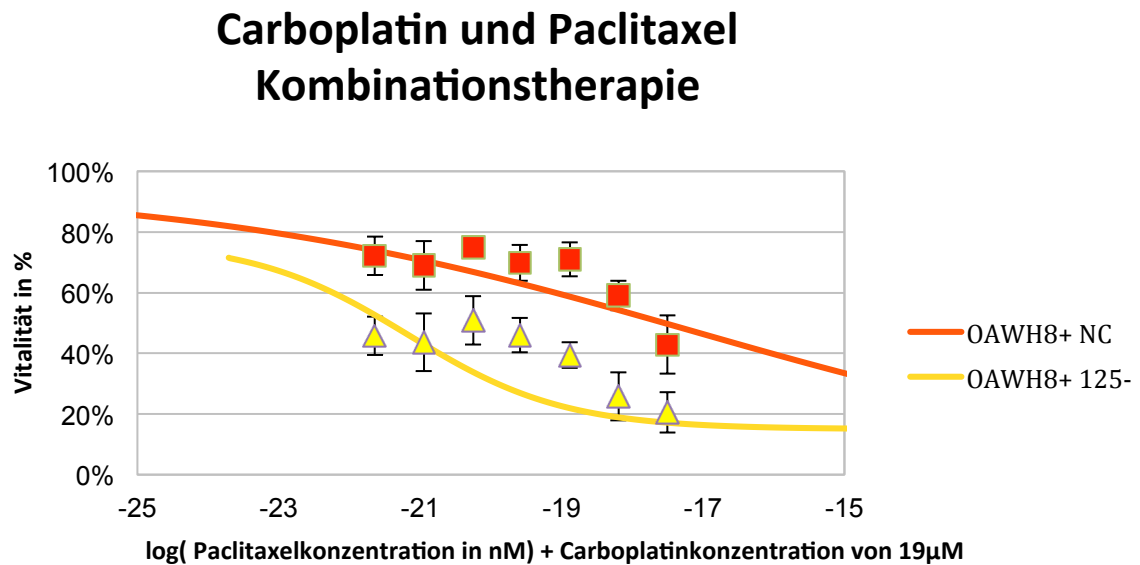


Abbildung 12: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁻ Knockdownzellen im Vergleich zu CA125⁺ Kontrollzellen mittels MTT in der Zelllinie OAWH8⁺. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte nach Monolayerkultur unter Verwendung einer festen Carboplatinkonzentration (25 μM) und unterschiedlichen Paclitaxelkonzentrationen.

In der Kombinationstherapie wurde der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von Paclitaxel zusammen mit 25 μM Carboplatin (in vorherigen Versuchen ermittelte IC₅₀ für die OAWH8⁺ CA125⁻ Zellen) auf den CA125⁻ Knockdownklon gegenüber dem NC Klon untersucht (Abbildung 12).

Entsprechend der Chemosensitivität, wie sie schon im Carboplatin-Mono-Assay ermittelt werden konnte, nimmt die Vitalität der OAWH8⁺ CA125⁻ Knockdownzelle im Vergleich zum OAWH8⁺ NC Klon signifikant ($p < 0,05$) stärker ab. Entsprechend liegt die IC₅₀ für den Knockdownklon bei 0,6 nM, die der CA125⁺ Kontrolle hingegen bei 15 nM.

4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse beider Zelllinien

Aus diesen Vitalitätsbestimmungen geht für die Zelllinie OAWB8⁻ zusammenfassend hervor, dass CA125⁻ Knockdownzellen resistenter auf die Carboplatintherapie reagieren als die OAWB8⁻ NC Zellen.

Hingegen wurde bei der Zelllinie OAWH8⁺ eine deutlich höhere Sensitivität auf Carboplatin des CA125⁻ Knockdownklons gegenüber dem NC Klon festgestellt. Weiterhin ist den Daten für die OAWB8⁻ Zelllinie zu entnehmen, dass bei den CA125⁻ Knockdownzellen, zumindest für geringe Paclitaxelkonzentrationen, eine merkbare Sensitivität zu beobachten ist. Für die Zelllinie OAWH8⁺ kann für die beiden Klone bei der Paclitaxel-Monotherapie kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Insgesamt kann ein divergentes Vitalitätsverhalten der beiden Zelllinien beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den Monotherapien zeigen sich bei den Kombinationstherapien für beide Zelllinien eine höhere Sensitivität der Knockdownklone und daher kein divergentes Verhalten. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick der gemessenen IC₅₀-Werte in beiden Zelllinien.

Zelllinie	Chemotherapie	IC₅₀-Wert
OAWB8 ⁻ NC	Carboplatin	13,5 µM
OAWB8 ⁻ NC	Paclitaxel	0,8 nM
OAWB8 ⁻ NC	Kombinationstherapie (Carboplatin+Paclitaxel)	0,13 nM
OAWB8 ⁻ 125 ⁻	Carboplatin	20,1 µM
OAWB8 ⁻ 125 ⁻	Paclitaxel	0,4 nM
OAWB8 ⁻ 125 ⁻	Kombinationstherapie (Carboplatin+Paclitaxel)	0,012 nM

Tabelle 5: Überblick der IC₅₀-Werte in der Zelllinie OAWB8⁻ nach Behandlung mit Carboplatin, Paclitaxel und Kombinationstherapie.

Zelllinie	Chemotherapie	IC₅₀-Wert
OAWH8 ⁺ NC	Carboplatin	31,1 µM
OAWH8 ⁺ NC	Paclitaxel	7,9 nM
OAWH8 ⁺ NC	Kombinationstherapie (Carboplatin+Paclitaxel)	15,2 nM
OAWH8 ⁺ 125 ⁻	Carboplatin	20,5 µM
OAWH8 ⁺ 125 ⁻	Paclitaxel	5,3 nM
OAWH8 ⁺ 125 ⁻	Kombinationstherapie (Carboplatin+Paclitaxel)	0,6 nM

Tabelle 6: : Überblick der IC₅₀-Werte in der Zelllinie OAWH8⁺ nach Behandlung mit Carboplatin, Paclitaxel und Kombinationstherapie.

4.4 Sphäroidbildung

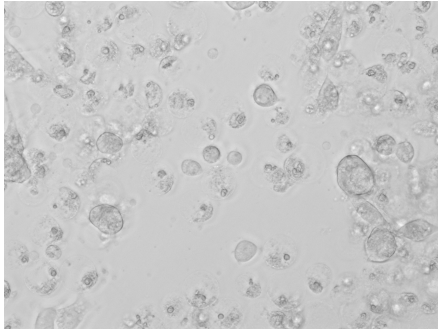
Die Bildung von Zellaggregaten, sogenannter Sphäroide, gehört u.a. zu den Stammzeleigenschaften von Tumorzellen. Es ist prinzipiell möglich, in vitro Tumorstammzellen als freischwimmende Zellkonglomerate zu kultivieren. Die Bildung von Sphäroiden ist auch im Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu finden.

Um die optimalen Wachstumsbedingungen zur Sphäroidbildung von Ovarialkarzinomzellen herauszufinden, wurden für die Zelllinie OAWB8⁻ zunächst unterschiedliche Kulturmedien und Kulturplatten getestet: RPMI-Medium , das zuvor schon zur Kultivierung der adhärennten Zellen benutzt wurde und serumfreies DMEM/Ham's F12 Medium (Sphäroidmedium), das zusätzlich Insulin enthält. Des Weiteren wurden Suspensionsplatten und Low-Attachment-Platten verglichen, wobei Letztere durch eine besondere Beschichtung die Adhäsion der Zellen an den Plattenboden und den Plattenwänden verhindert. Die Sphäroidbildung wurde zunächst nach 2- und 4-tägiger bzw. in späteren Versuchen nach 2- und 6-tägiger Kultivierung lichtmikroskopisch beurteilt.

4.4.1 Sphäroidbildung der Zelllinie OAWB8⁻ auf der Suspensionsplatte

Kultivierung von OAWB8⁻ NC Zellen in DMEM/Ham's F12 Medium (Sphäroidmedium) auf der Suspensionsplatte

A



B

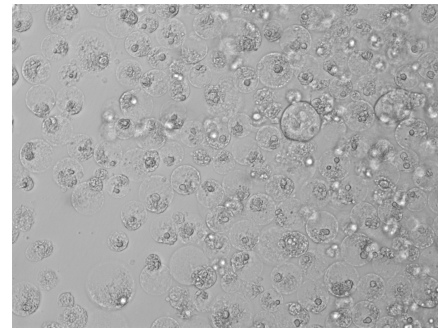
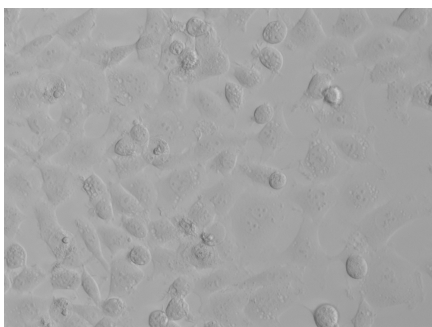


Abbildung 13: OAWB8⁻ NC Zellen nach 2 Tagen (A) und nach 4 Tagen (B) auf Suspensionsplatte in Sphäroidmedium.

Die Lichtmikroskopie zeigte an Tag 2 bereits keine vitalen OAWB8⁻ NC Zellen mehr (Abbildung 13). Eine Sphäroidbildung kann daher nicht beobachtet werden.

Kultivierung von OAWB8⁻ NC Zellen in RPMI Medium auf der Suspensionsplatte

A



B

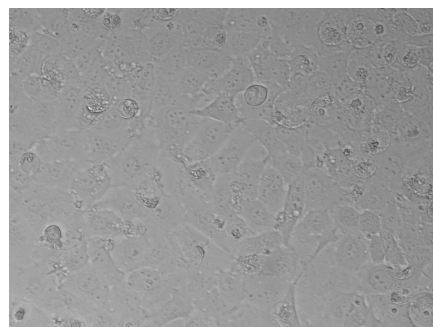
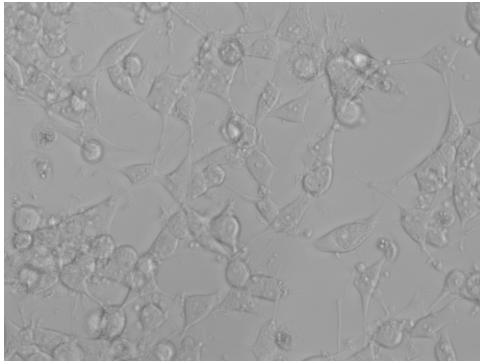


Abbildung 14: OAWB8⁻ NC Zellen nach 2 Tagen (A) und nach 4 Tagen (B) auf Suspensionsplatte in RPMI- Medium.

Nach 2 Tagen zeigen sich im RPMI-Medium vitale und adhärent wachsende OAWB8⁻ Zellen (Abbildung 14 A). Am Tag 4 sind zwischen den adhären Zellen vereinzelt tote Zellen sichtbar (Abbildung 14 B). Eine Sphäroidbildung kann zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

Kultivierung von OAWB8⁺ CA125⁻ Zellen in DMEM/Ham's F12 Medium (Sphäroidmedium) auf der Suspensionsplatte

A



B

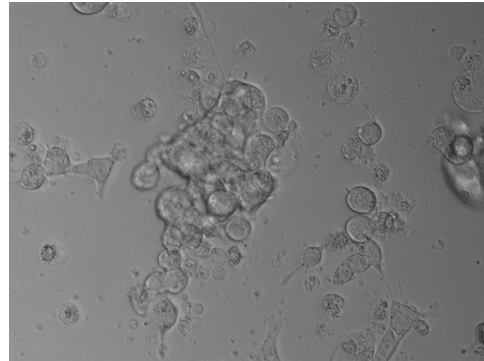
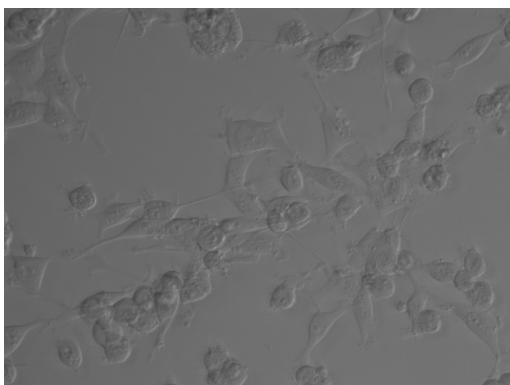


Abbildung 15: OAWB8⁺ CA125⁻ Knockdownzellen nach 2 Tagen (A) und nach 4 Tagen (B) auf Suspensionsplatte in Sphäroidmedium.

Nach zwei Tagen zeigen sich im DMEM/Ham's F12 Medium vitale OAWB8⁺ CA125⁻ Zellen, die adhären wachen (Abbildung 15 A). Vereinzelt sind abgerundete oder auch tote Zellen zu beobachten. An Tag 4 hat eine Bildung von Zellaggregaten stattgefunden (Abbildung 15 B). Es finden sich des Weiteren vereinzelt adhären und tote Zellen.

Kultivierung von OAWB8⁺ CA125⁻ Zellen in RPMI Medium auf der Suspensionsplatte

A



B

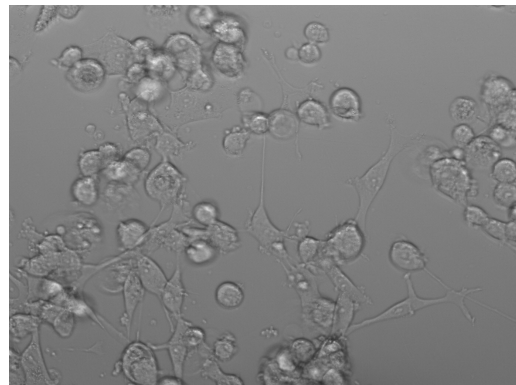


Abbildung 16: OAWB8⁺ CA125⁻ Knockdownzellen nach 2 Tagen (A) und nach 4 Tagen (B) auf Suspensionsplatte in RPMI-Medium.

Nach zwei Tagen finden sich im RPMI-Medium vitale und adhären OAWB8⁺ CA125⁻ Zellen (Abbildung 16 A). Am Tag 4 sind vereinzelt Zellaggregate

abgerundeter und vitaler Zellen zu beobachten (Abbildung 16 B). Weiterhin zeigen sich adhärente und auch vereinzelt tote Zellen.

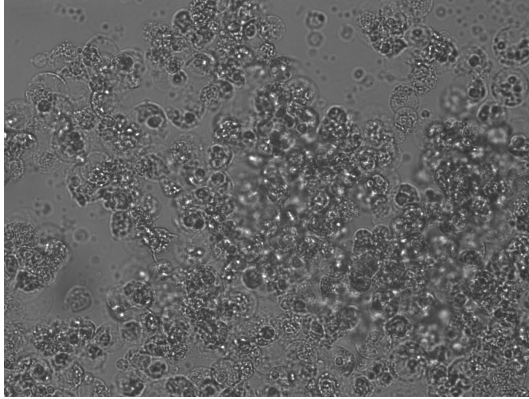
Zusammenfassend wurde für die OAWB8⁻ NC Zellen unter keiner der beiden Kulturbedingungen eine Sphäroidbildung beobachtet (Abbildung 13, Abbildung 14). Dagegen scheint der Knockdownklon OAWB8⁻ CA125⁻ besser in der Lage zu sein, Sphäroide zu bilden. In beiden Kulturmedien zeigte sich hier eine deutliche Bildung von Zellaggregaten, die auf eine beginnende Sphäroidbildung schließen lassen (Abbildung 15, Abbildung 16). Besonders ausgeprägt war dies nach 4 Tagen Kultivierung im DMEM/Ham's F12 Medium zu beobachten (Abbildung 15). Allerdings zeigen sich auch hier immer noch adhärente Zellen, weswegen die Suspensionsplatte für das Sphäroidwachstum nicht optimal geeignet zu sein scheint.

4.4.2 Sphäroidbildung der Zelllinie OAWB8⁻ auf der Low-Attachment-Platte

Da sich die Suspensionsplatte nicht für das Sphäroidwachstum eignete, wird im folgenden Versuch eine Low-Attachment-Platte verwendet. Des Weiteren wird auf die Verwendung des RPMI Mediums verzichtet, da sich dieses im vorherigen Versuch ebenfalls als nicht geeignet für die Sphäroidbildung herausstellt hat. Im Folgenden wird daher nur noch das DMEM/Ham's F12 Medium verwendet.

Kultivierung von OAWB8⁻ NC Zellen in DMEM/Ham's F12 Medium (Sphäroidmedium) auf der Low Attachment-Platte

A



B

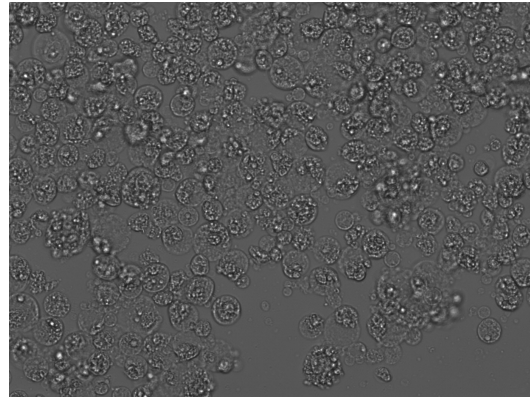
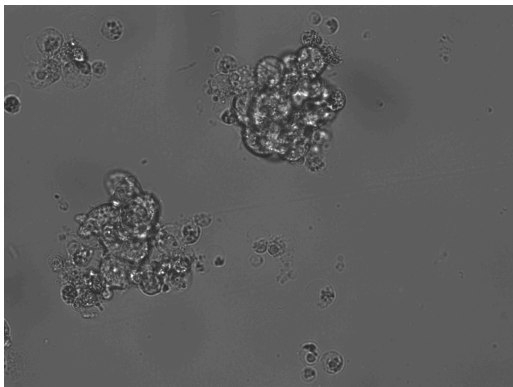


Abbildung 17: OAWB8⁻ NC Zellen nach 2 Tagen (A) und nach 6 Tagen (B) auf Low-Attachment-Platte in Sphäroidmedium.

Auch auf der Low-Attachment Platte zeigen sich im DMEM/Ham's F12 Medium bereits nach 2 Tagen keine vitalen OAWB8⁻ CA125⁺ Zellen mehr (Abbildung 17).

Kultivierung von OAWB8⁻ CA125⁻ Zellen im DMEM/Ham's F12 Medium auf der Low Attachment-Platte

A



B

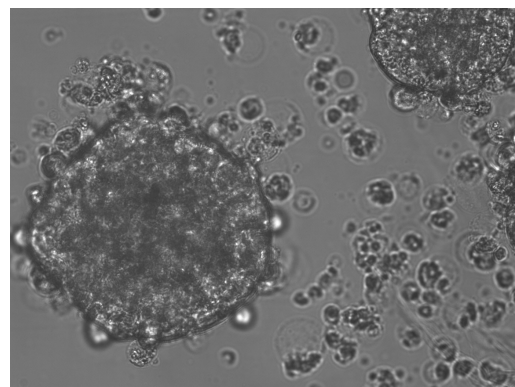


Abbildung 18: OAWB8⁻ CA125⁻ Knockdownzellen nach 2 Tagen (A) und nach 6 Tagen (B) auf Low-Attachment-Platte in Sphäroidmedium.

Auf den Low-Attachment-Platten bilden sich bei den OAWB8⁻ CA125⁻ Zellen bereits nach 2 Tagen vereinzelt kleine Zellaggregate (Abbildung 18 A). Nach 6 Tagen ist eine deutliche Sphäroidbildung zu erkennen (Abbildung 18 B). Die Zellen zeigen

keine Adhärenz an der Plattenwand mehr und schwimmen als Sphäroide frei im Medium. Zwischen den Sphäroiden finden sich auch einige tote Zellen.

Zusammenfassend zeigte der OAWB8⁻ NC Klon auf der Low-Attachment-Platte keine Sphäroidbildung. Hingegen wurden für den Knockdownklon OAWB8⁻ CA125⁻ nach 6 Tagen deutlich vereinzelt Sphäroide beobachtet, die frei im Medium schwimmen.

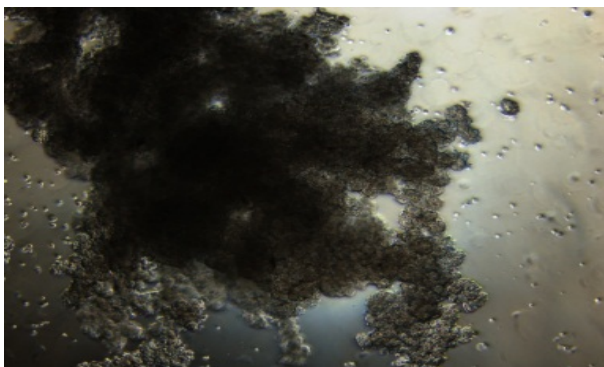
4.4.3 Sphäroidbildung der Zellreihe OAWH8⁺

Im folgenden Versuch soll die Fähigkeit zur Sphäroidbildung von OAWH8⁺ Zellen untersucht werden.

Für die Zellreihe OAWB8⁻ haben sich im vorherigen Versuch bereits das DMEM/Ham's F12 Medium und die Low-Attachment-Platte als günstig für das Sphäroidwachstum erwiesen. Daher wird für die Zellreihe OAWH8⁺ ausschließlich das DMEM/Ham's F12 Medium verwendet. Auf das RPMI-Medium wird in diesem Versuch verzichtet.

Da für spätere Versuche eine höhere Zellzahl benötigt wird, als auf den Low-Attachment-Platten in Sphäroiden kultiviert werden kann, werden im folgenden Versuch mit Agarose beschichtete Petrischalen, die einen größeren Plattenumfang besitzen, verwendet. Die Agarose verhindert die Adhärenz der Zellen am Plattenboden, so dass die Zellen wie auch in den Low-Attachment-Platten frei im Medium schwimmen.

A



B

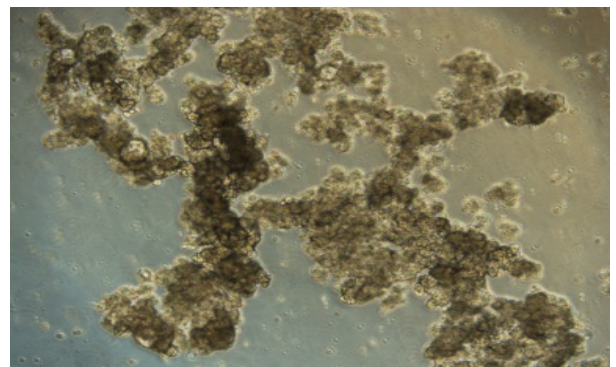


Abbildung 19: (A) OAWH8⁺ NC Zellen nach 6 Tagen und (B) OAWH8⁺ CA125⁻ Knockdownzellen nach 6 Tagen auf Agarose-Petrischale in Sphäroidmedium.

Für die Zelllinie OAWH8⁺ zeigt sich, dass beide Klone zur Sphäroidbildung fähig sind, wobei diese beim OAWH8⁺ CA125⁻ Knockdownklon weniger stark ausgeprägt waren als beim OAWH8⁺NC (Abbildung 19).

4.5 Einfluss von CA125 auf die Chemosensitivität von Ovarialkarzinomzellen nach Sphäroidkultur

Die Mehrzahl der eingesetzten Chemotherapeutika zur Behandlung solider Tumore sind ineffektiv bezüglich der Beeinflussung des Sphäroidwachstums und der Dissemination. Sphäroide des Ovarialkarzinoms zeigen im Vergleich zu einschichtigen, adhärennten Ovarialtumorzellen eine verminderte Apoptoserate nach Behandlung mit den herkömmlichen Chemotherapeutika sowie nach Bestrahlung (L'Espérance et al., 2008; Makhija et al., 1999).

Um die Auswirkung der Sphäroidbildung auf die Chemosensitivität im Vergleich zu den adhärennten Ovarialkarzinomzellen zu testen, wurde der MTT-Assay (s. Kapitel 3) unter Sphäroidkulturbedingungen wiederholt. Dazu wurden die Ovarialkarzinomzellen 6 Tage lang als Sphäroide in mit Agarose beschichteten Petrischalen kultiviert und anschließend für den MTT-Assay vereinzelt (s. Methoden). Da OAWB8⁻ NC Zellen keine Sphäroide bilden (s. Kapitel 4.), wurde für diese Zelllinie nur der OAWB8⁻ CA125⁻ Klon verwendet. In der Zelllinie OAWH8⁺ konnte für beide Klone eine Sphäroidbildung nachgewiesen werden. Für diese Zelllinie wurden daher sowohl der NC als auch der CA125⁻ Knockdownklon verwendet.

4.5.1 Chemosensitivität der Zelllinie OAWB8⁻ in Sphäroidkultur

Carboplatin-Monotherapie

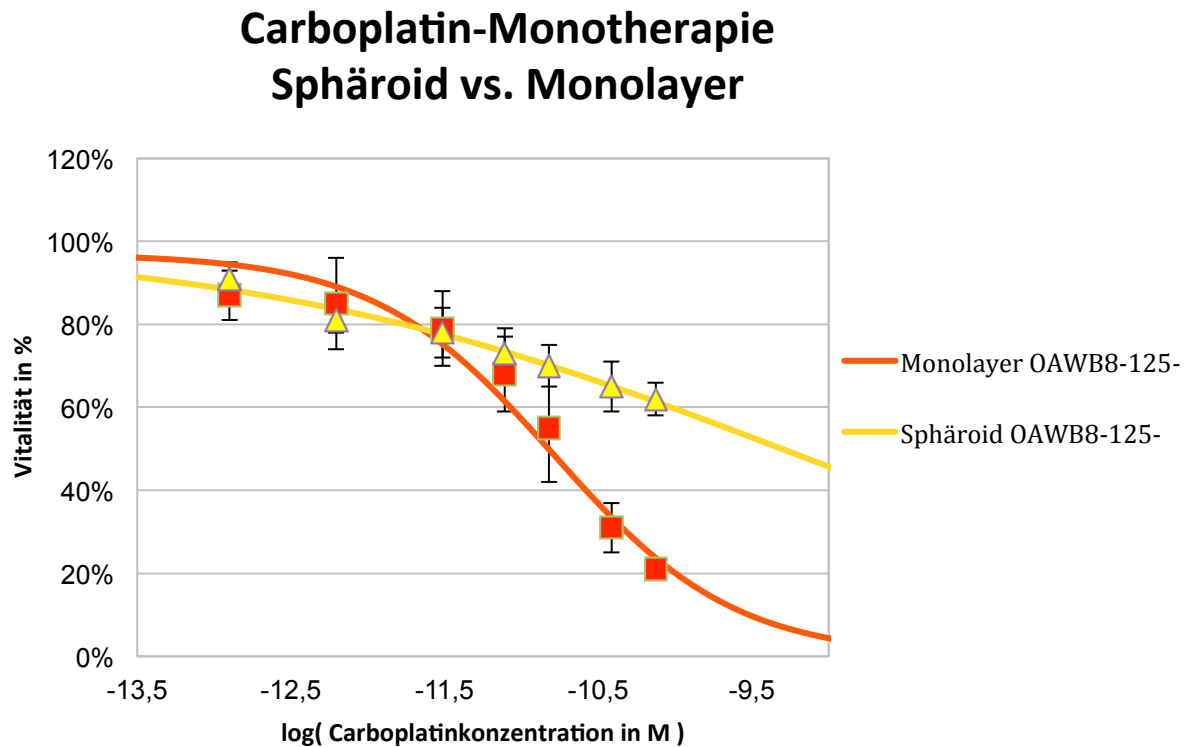


Abbildung 20: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁻ Knockdownzellen nach Monolayerkultur und nach Sphäroidkultur im Vergleich mittels MTT in der Zelllinie OAWB8⁻. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte sowohl in Mono- als auch in Sphäroidkultur unter Verwendung unterschiedlicher Carboplatinkonzentrationen.

In niedrigen Carboplatinkonzentrationen zeigt sich kein Unterschied in der Chemosensitivität der CA125⁻ OAWB8⁻ Sphäroide gegenüber den CA125⁻ OAWB8⁻ adhärenenten Zellen (Abbildung 20). Erst bei höheren Konzentrationen von Carboplatin ($\geq 20 \mu\text{M}$) erweist sich der Knockdownklon in Sphäroidkultur als chemoresistenter als die der Zellen in Monolayerkultur.

Während die IC_{50} für die Zellen in Monolayerkultur bei $20,6 \mu\text{M}$ Carboplatin liegt, ist die IC_{50} der Zellen in Sphäroidkultur $\geq 90 \mu\text{M}$ (Tabelle 7) und konnte daher in diesem Assay nicht genau errechnet, sondern nur ungefähr abgeschätzt werden. Die Zellen in Sphäroidkultur sind somit deutlich resistenter gegenüber Carboplatin.

Paclitaxel-Monotherapie Sphäroid vs. Monolayer

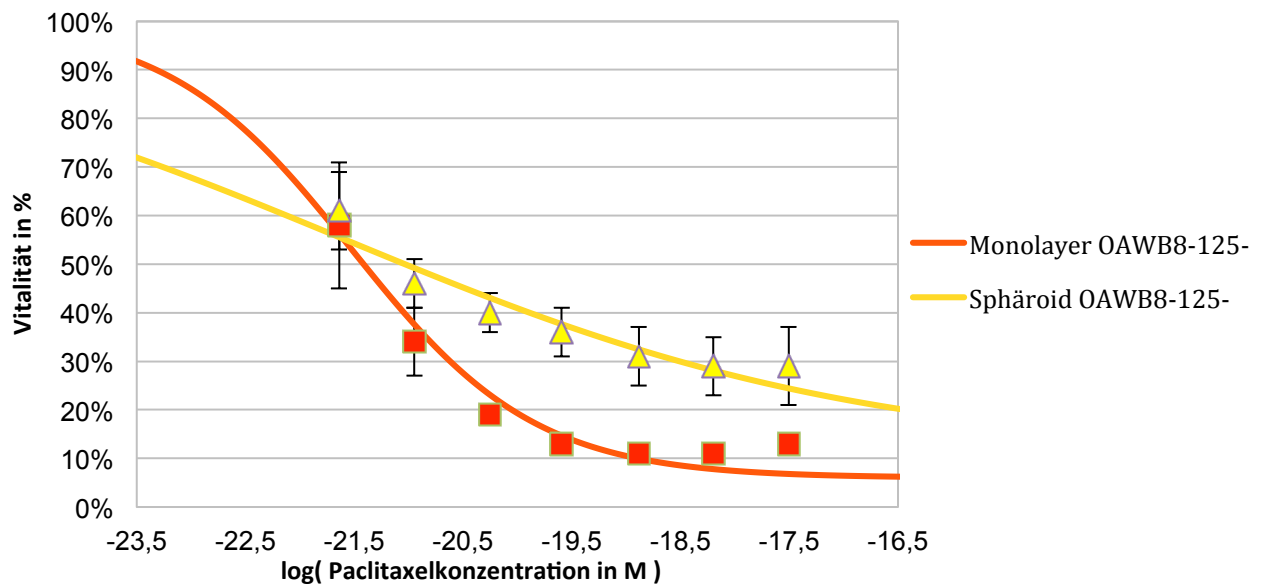


Abbildung 21: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125-Knockdownzellen nach Monolayerkultur und nach Sphäroidkultur im Vergleich mittels MTT in der Zelllinie OAWB8. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte sowohl in Monolayer- als auch in Sphäroidkultur unter Verwendung unterschiedlicher Paclitaxelkonzentrationen.

Die IC₅₀ der Sphäroidkultur liegt bei 0,41 nM Paclitaxel, die der Monolayerkultur bei 0,45 nM. Der Unterschied der IC₅₀-Werte ist marginal, bei höheren Paclitaxelkonzentrationen ($\geq 1,6$ nM) zeigt sich jedoch eine deutlich höhere Chemoresistenz des Klons in Sphäroidkultur gegenüber dem Klon in Monolayerkultur (Abbildung 21, Tabelle 7).

4.5.2 Chemosensitivität der Zelllinie OAWH8⁺ in Sphäroidkultur

Carboplatin-Monotherapie

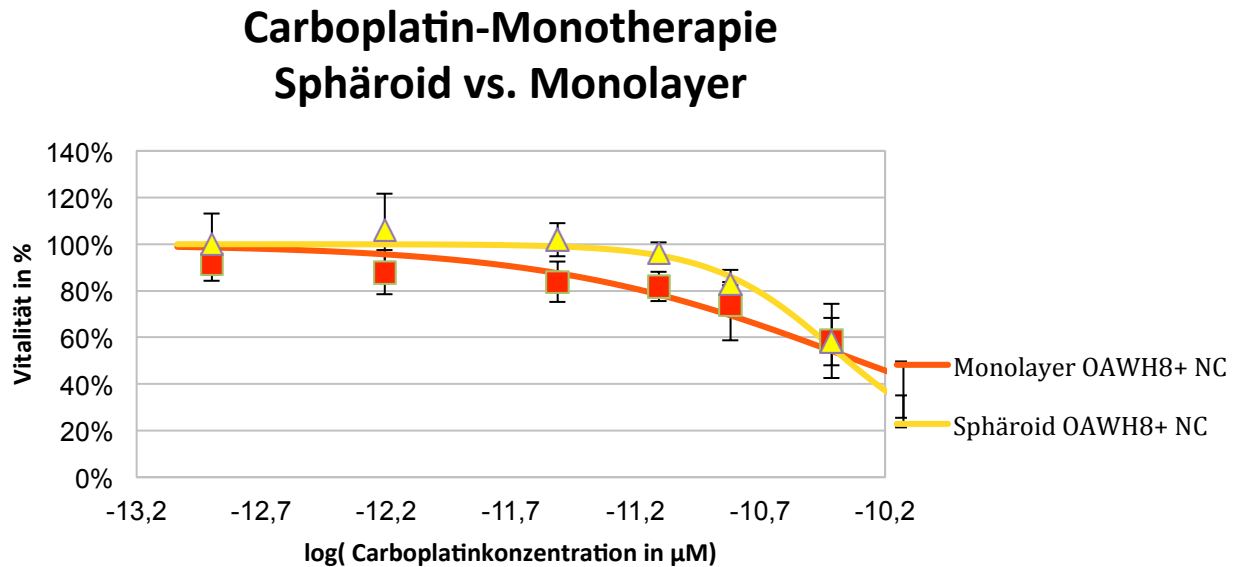


Abbildung 22: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁺ Kontrollzellen nach Monolayerkultur und nach Sphäroidkultur im Vergleich mittels MTT in der Zelllinie OAWH8⁺. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte sowohl in Monolayer- als auch in Sphäroidkultur unter Verwendung unterschiedlicher Carboplatinkonzentrationen.

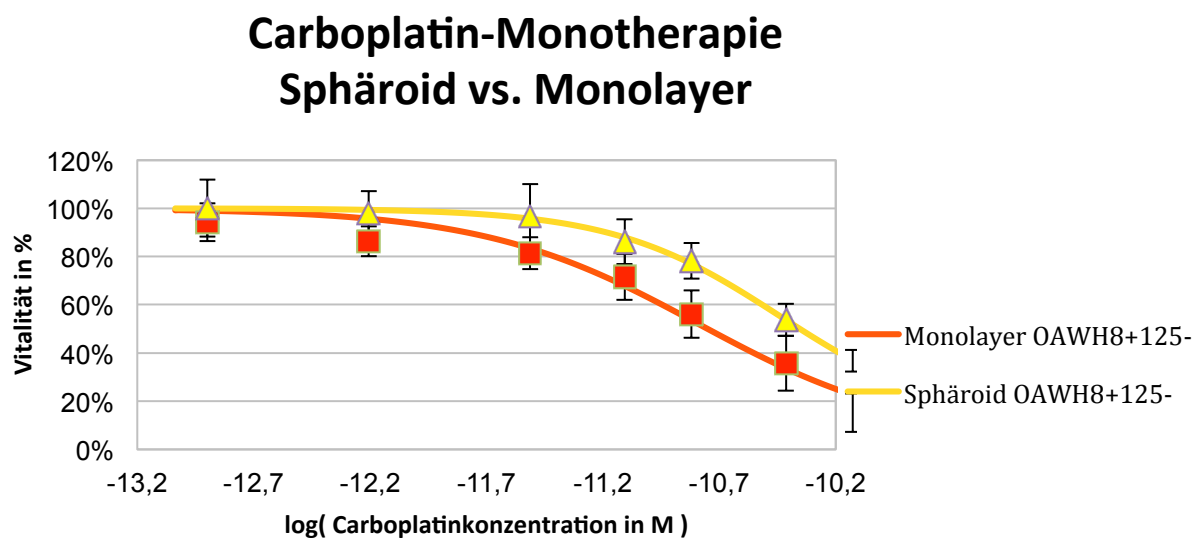


Abbildung 23: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁻ Knockdownzellen nach Monolayerkultur und nach Sphäroidkultur im Vergleich mittels MTT in der Zelllinie OAWH8⁺. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte sowohl in Monolayer- als auch in Sphäroidkultur unter Verwendung unterschiedlicher Carboplatinkonzentrationen.

Der MTT-Assay zur Analyse der Carboplatinresistenz des OAWH8⁺ NC Klon in Sphäroidkultur gegenüber dem Klon in Monolayerkultur ergab einen geringen Unterschied, wobei sich die Zellen in Sphäroidkultur wieder resistenter gegenüber der Carboplatintherapie darstellen (Abbildung 22). Die IC₅₀ der Zellen in Monolayerkultur beträgt dabei 32 µM, die der Sphäroidkultur 30 µM (Tabelle 8).

Bei den OAWH8⁺ CA125⁻ Knockdownzellen hingegen weist der Klon in Sphäroidkultur eine signifikant ($p < 0,045$) erhöhte Carboplatinresistenz im Vergleich zur Monolayerkultur auf (Abbildung 23). Der Unterschied ist dabei eindeutiger. Die IC₅₀ der Knockdownzellen in Sphäroidkultur liegt bei 30 µM Carboplatin, die der Knockdownzellen in Monolayerkultur liegt hingegen bereits bei 20 µM Carboplatin (Tabelle 8).

Paclitaxel-Monotherapie

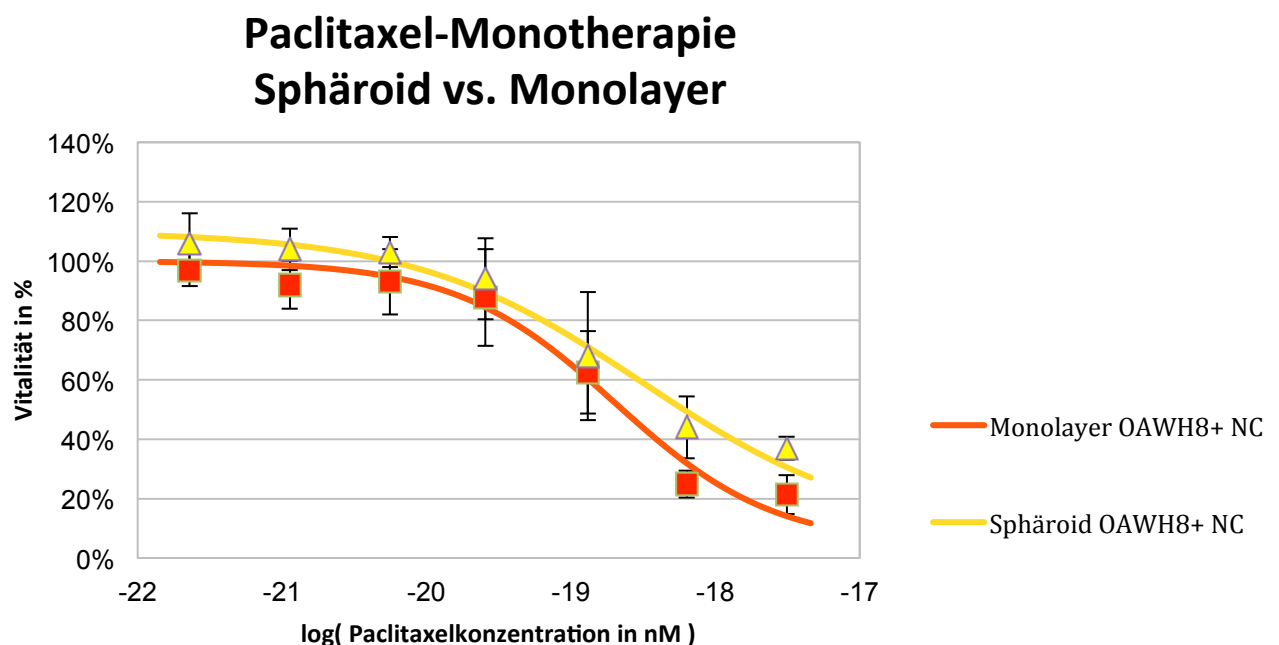


Abbildung 24: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁺ Kontrollzellen in Monolayerkultur und nach Sphäroidkultur im Vergleich mittels MTT in der Zelllinie OAWH8⁺. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte sowohl in Monolayer- als auch in Sphäroidkultur unter Verwendung unterschiedlicher Paclitaxelkonzentrationen.

Paclitaxel-Monotherapie Sphäroid vs. Monolayer

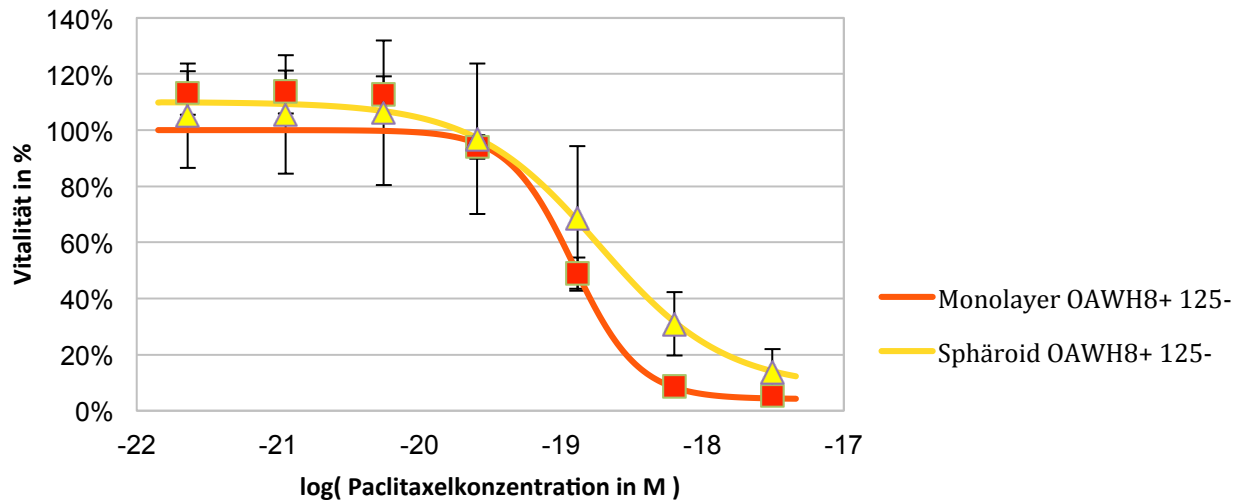


Abbildung 25: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁻ Knockdownzellen nach Monolayerkultur und nach Sphäroidkultur im Vergleich mittels MTT in der Zelllinie OAWH8⁺. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte sowohl in der Monolayer- als auch in der Sphäroidkultur unter Verwendung unterschiedlicher Paclitaxelkonzentrationen.

Die Paclitaxel-Monotherapie der OAWH8⁺ NC Zellen in Monolayer- und Sphäroidkultur ergab hinsichtlich der Chemoresistenz einen geringen Unterschied (Abbildung 24). Die IC₅₀ beträgt für die Sphäroidkultur 9,2 nM, für die Monolayerkultur 7,6 nM. Der Klon in Monolayerkultur ist somit etwas sensibler gegenüber der Chemotherapie mit Paclitaxel (Tabelle 8).

Für die OAWH8⁺ CA125⁻ Zellen zeigt sich in Monolayer- und Sphäroidkultur bezüglich der Chemoresistenz ebenfalls ein nur geringer Unterschied, wobei der Klon in Monolayerkultur wieder etwas sensibler gegenüber der Paclitaxeltherapie zu sein scheint (Abbildung 25). Die IC₅₀ liegt für die Sphäroidkultur bei 7,3 nM, für die Monolayerkultur bei 6,1 nM (Tabelle 8).

4.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse beider Zelllinien

Zusammenfassend kann für beide Zelllinien beobachtet werden, dass die Zellen in Sphäroidkultur eine deutliche Resistenz gegenüber Carboplatin und Paclitaxel aufweisen. Dabei erwiesen sich die OAWB8⁻ CA125⁻ Knockdownzellen in

Sphäroidkultur als deutlich resistenter gegenüber Carboplatin als in Monolayerkultur (Abbildung 20).

Für die Zelllinie OAWH8⁺ wurde für die Carboplatintherapie ein deutlicherer Unterschied zwischen den Zellen in Sphäroid- und Monolayerkultur beobachtet als für die Paclitaxeltherapie. Dabei wurde bei beiden Therapien für den CA125⁻ Klon eine erhöhte Resistenz der Zellen in Sphäroidkultur im Vergleich zu den Zellen in Monolayerkultur detektiert. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die gemessenen IC₅₀-Werte in beiden Zelllinien.

Zellreihe	Chemotherapie	IC₅₀-Wert
Monolayer OAWB8 ⁻ 125 ⁻	Carboplatin	20,6 µM
Sphäroid OAWB8 ⁻ 125 ⁻	Carboplatin	~ 90 µM
Monolayer OAWB8 ⁻ 125 ⁻	Paclitaxel	0,45 nM
Sphäroid OAWB8 ⁻ 125 ⁻	Paclitaxel	0,41 nM

Tabelle 7: : Überblick der IC₅₀-Werte in der Zelllinie OAWB8⁻ nach Behandlung mit Carboplatin, Paclitaxel und Kombinationstherapie in Monolayer- und Sphäroidkultur.

Zellreihe	Chemotherapie	IC₅₀-Wert
Monolayer OAWH8 ⁺ NC	Carboplatin	31,7 µM
Sphäroid OAWH8 ⁺ NC	Carboplatin	30,2 µM
Monolayer OAWH8 ⁺ 125 ⁻	Carboplatin	20,6 µM
Sphäroid OAWH8 ⁺ 125 ⁻	Carboplatin	29,2 µM
Monolayer OAWH8 ⁺ NC	Paclitaxel	7,6 nM
Sphäroid OAWH8 ⁺ NC	Paclitaxel	9,2 nM
Monolayer OAWH8 ⁺ 125 ⁻	Paclitaxel	6,1 nM
Sphäroid OAWH8 ⁺ 125 ⁻	Paclitaxel	7,3 nM

Tabelle 8: Überblick der IC₅₀-Werte in der Zelllinie OAWH8⁺ nach Behandlung mit Carboplatin, Paclitaxel und Kombinationstherapie in Monolayer- und Sphäroidkultur.

4.6 Vergleich der NC-Zellen und der CA125⁻ Klone der Zelllinie OAWH8⁺ in Sphäroidkultur

Um den Einfluss von CA125 auf die Chemoresistenz der Zellen in Sphäroidkultur zu beurteilen, wurden die NC Zellen und die CA125⁻ Klone der Zelllinie OAWH8⁺ untersucht. Die Zelllinie OAWB8⁻ konnte dabei nicht verwendet werden, da die NC Zellen nicht in der Lage waren, Sphäroide zu bilden und somit die CA125⁺ Kontrolle für den Knockdownklon fehlt.

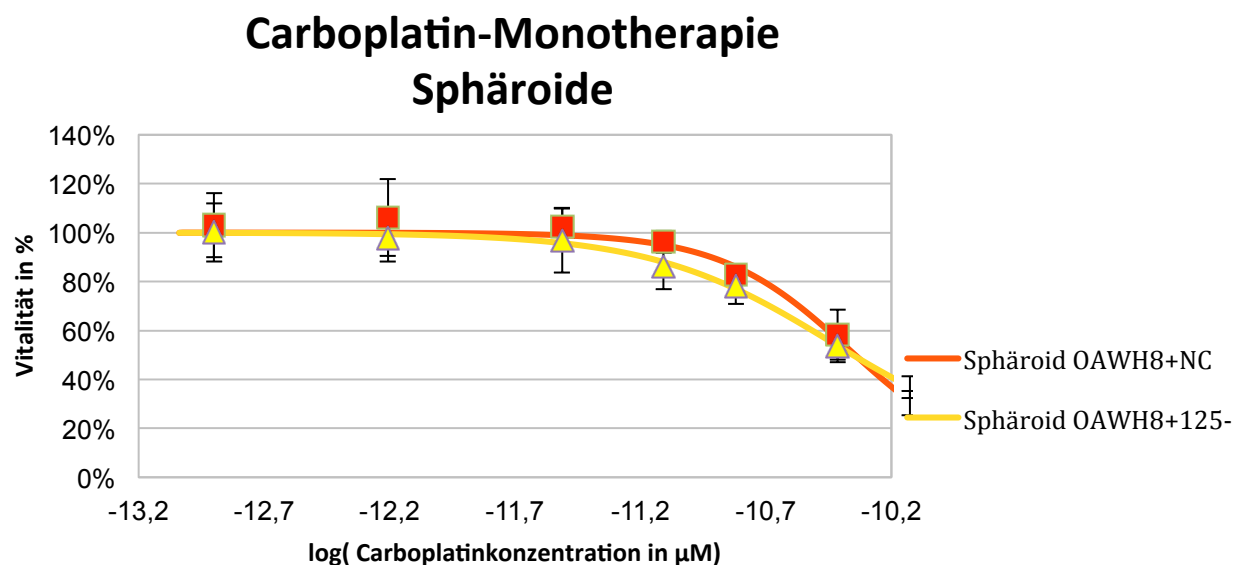


Abbildung 26: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125⁻ Knockdownzellen im Vergleich zu CA125⁺ Kontrollzellen mittels MTT in der Zelllinie OAWB8⁻. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte nach Sphäroidkultur unter Verwendung unterschiedlicher Carboplatinkonzentrationen.

Vergleicht man den CA125⁻ Klon der Zelllinie OAWH8⁺ unter Carboplatinbehandlung mit seiner CA125⁺ Kontrolle ist kein Unterschied in der Vitalität festzustellen. Somit ergibt sich auch kein Unterschied bezüglich des Chemoresistenzverhaltens der Klone in Sphäroidkultur (Abbildung 26).

Paclitaxel-Monotherapie Sphäroide

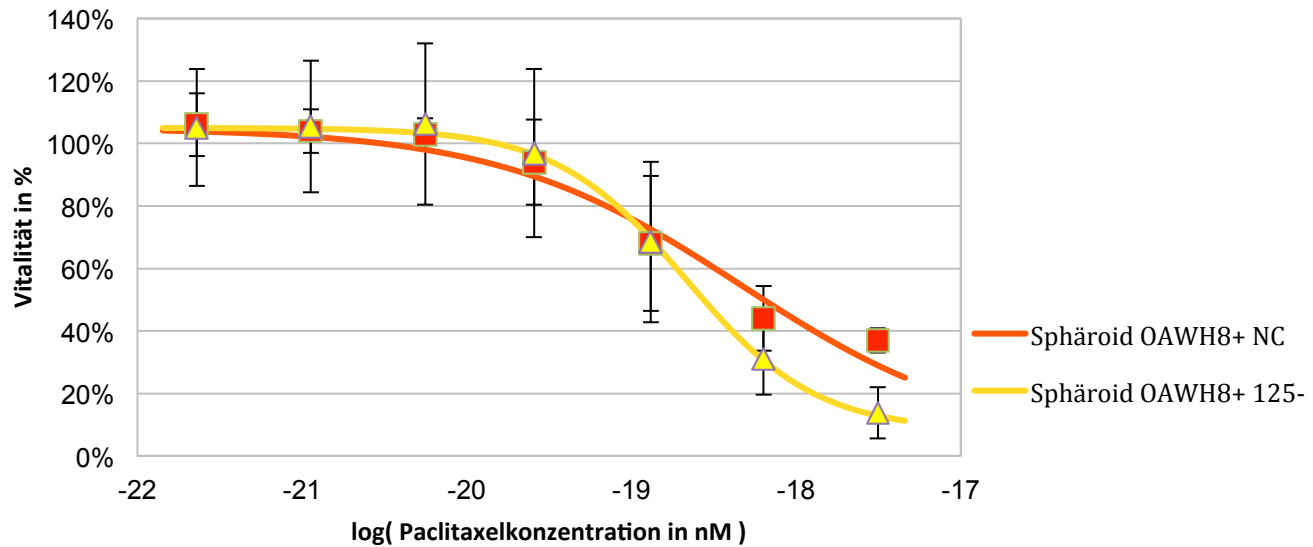


Abbildung 27: Bestimmung der Chemosensitivität von CA125- Knockdownzellen im Vergleich zu CA125+ Kontrollzellen mittels MTT in der Zelllinie OAWB8. Die Chemosensitivitätsbestimmung erfolgte nach Sphäroidkultur unter Verwendung unterschiedlicher Paclitaxelkonzentrationen.

Der CA125- Knockdownklon der Zelllinie OAWH8+ scheint unter Sphäroidkultur sensibler auf die Paclitaxeltherapie zu reagieren als seine CA125+ Kontrolle. Ähnliches konnte bereits in der Monolayerkultur für diese Zelllinie unter Paclitaxeltherapie festgestellt werden (Abbildung 27).

5 Diskussion

5.1 Das gewählte CA125 Knockdownmodell

Zur Evaluation der Funktion von CA125 stehen prinzipiell zwei Methoden zur Verfügung. Zum einen käme eine Überexpression des CA125 Moleküls in einer CA125 negativen Zelllinie, wie beispielsweise der Skov-3 Zelllinie, in Frage. Allerdings ist aufgrund der enormen Größe von CA125 eine vollständige Überexpression von CA125 bis heute noch keiner Arbeitsgruppe vollständig gelungen.

Zum anderen kann die Synthese von CA125, in einer CA125⁺ Zelllinie, mittels Knockdown herunterreguliert werden. Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt. Um mittels Knockdown stabile CA125 negative Klone zu erhalten, wurde die Methode der short hairpin RNA (shRNA) Interferenz gewählt. Nach Transfektion des shRNA Plasmids in die Zelle, können diese über eine Antibiotikaresistenz selektioniert und angereichert werden. Dadurch können Gene durch die ständige Produktion neuer shRNA stabil herunterreguliert und auch langfristige Effekte untersucht werden. Die Sequenz für die shRNA folgt komplexen Kriterien, wobei der Hersteller SABioscience einen spezifischen sowie effizienten Knockdown von mindestens 70 % garantiert.

Generell dienen die Kultivierung humaner Zellen und deren Manipulation dazu, verschiedene zelluläre Prozesse zu untersuchen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse sollten allerdings mit Vorbehalt betrachtet werden, da komplexe Vorgänge innerhalb des Körpers nur sehr vereinfacht nachgestellt werden können.

5.2 Expression von Tumorstammzellmarkern auf der Zelloberfläche

Der Tumorstammzellhypothese zufolge existiert innerhalb eines Tumors eine Subpopulation von Zellen, die in der Lage sind, Tumorstammzellen zu initiieren und aufrechtzuerhalten. Neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multipotenz zeichnen sich Tumorstammzellen auch durch ihre Resistenz gegenüber Chemotherapie aus. Dabei wird diskutiert, ob die meist chemoresistenten

Tumorrezidive durch eine vermehrte Proliferation ursprünglich resistenter Tumorstammzellen zu erklären sind (Tanei et al., 2009).

Auch das Ovarialkarzinom ist gekennzeichnet durch eine hohe Rezidivrate und eine im Verlauf auftretende Chemoresistenz. Der Tumorstammzelltheorie zufolge, könnten diese Eigenschaften hauptsächlich auf der Selektion von Tumorstammzellen beruhen. Dabei wird in der Theorie des Tumorstammzellmodells allerdings von einer nur sehr geringen Population von Tumorstammzellen ausgegangen (Silva et al., 2011; Y.-C. Wang et al., 2012).

In der Literatur wird eine Vielzahl unterschiedlicher Tumorstammzellmarker diskutiert, die Tumorstammzellen zuverlässig detektieren können. Jedoch ist es bisher noch nicht gelungen spezifische Marker oder eine Kombination von Markern zu finden, mit deren Hilfe sich Tumorstammzellen des Ovarialkarzinoms eindeutig identifizieren lassen.

Die Glykoproteine CD133 (Prominin), CD24, CD44, CD117 sowie die Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH-1) werden in der Literatur vielfach als mögliche Marker für Tumorstammzellen diskutiert (Kryczek et al., 2012; Silva et al., 2011) und wurden daher auch in dieser Arbeit näher untersucht. Dabei sollte genauer betrachtet werden, welchen Einfluss die Expression bzw. der Knockdown von CA125 auf den Anteil der Tumorstammzellen innerhalb der Zelllinie und damit auch auf die Expression der Tumorstammzellmarker besitzt.

5.2.1 ALDH

In der Literatur ist eine erhöhte Expression der Aldehyd-Dehydrogenase 1 in Ovarialkarzinomzellen beschrieben, wobei dies ein Charakteristikum für Tumorstammzellen darstellt (Silva et al., 2011). Sowohl für die OAWB8- als auch die OAWH8+ Zelllinie geht die CA125 Expression mit einer erhöhten Expression von ALDH einher. Dies ist jedoch in der OAWB8- Zelllinie, welche eine ohnehin sehr niedrige CA125 Expression aufweist, wesentlich deutlicher zu sehen als in der OAWH8+ Zelllinie. Am ehesten ist dies durch Unterschiede in der CA125 Funktion zu erklären.

Des Weiteren ist der Anteil der ALDH⁺ Zellen in der OAWH8⁺ Zelllinie deutlich höher verglichen mit der Zelllinie OAWB8⁻. Dies spricht für einen wesentlich größeren Anteil an Tumorstammzellen in der OAWH8⁺ Zelllinie. Dabei ist zu beachten, dass das Tumorstammzellmodell von einer nur sehr kleinen Population von Tumorstammzellen ausgeht. Verglichen mit anderen etablierten Zelllinien des Ovarialkarzinoms, die einen weitaus geringeren Anteil (~ 0,1-6 %) ALDH⁺ Zellen aufweisen (Silva et al., 2011; Y.-C. Wang et al., 2012), ist daher fraglich, ob ALDH ein adäquater Marker zur Detektion von Tumorstammzellen ist. Ähnliches berichten auch Bareis und Kollegen, die herausfanden, dass ALDH negative Zellpopulationen in Ovarialkarzinomzellen in nahezu gleicher Regelmäßigkeit Tumore in Mäusen generierte wie ALDH⁺ Populationen („Aldehyde Dehydrogenase expression indicates proliferative activity in human ovarian carcinoma cells“, unpubliziert). Auch Chang und Kollegen berichten von einem günstigen Einfluss von ALDH⁺ Zellen auf das mediane, rezidivfreie Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom, was die Frage aufwirft, ob ALDH möglicherweise eine andere Funktion in Ovarialkarzinomzellen besitzt, als in z.B. Mammakarzinomzellen (Chang et al., 2009).

5.2.2 CD24 und CD44

Das Glycoprotein CD44 ist ein Beispiel für ein Oberflächenprotein, das vermehrt in Tumorstammzellen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wird CD24 vermindert in Tumorstammzellen gemessen.

CA125 scheint weder in der OAWH8⁺ noch in der OAWB8⁻ Zelllinie einen Einfluss auf die CD44 Expression zu haben. Im Gegensatz dazu zeigt der CA125 Knockdown in beiden Zelllinien eine signifikante Veränderung in der CD24-Expression. Dabei zeigt sich das Verhalten der beiden Zelllinien nach Knockdown wieder divergent. In der Zelllinie OAWH8⁺ geht der CA125 Knockdown mit einer gesteigerten Expression von CD24 einher, wohingegen er in der Zelllinie OAWB8⁻ eine niedrigere Expression erwirkt.

Geht man davon aus, dass Tumorstammzellen durch CD44⁺/CD24⁻ charakterisiert sind, weist die OAWB8⁻ Zelllinie einen enorm hohen Anteil von Tumorstammzellen

im Gegensatz zur Zelllinie OAWH8⁺ auf. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit dem durch ALDH festgelegten Anteil an Tumorstammzellen in den beiden Zelllinien. Des Weiteren ist auch hier zu bedenken, dass ein Tumorstammzellanteil von fast 100 % nicht dem Prinzip des Tumorstammzellmodells entspricht, das von einer eher kleinen Tumorstammzellpopulation ausgeht.

Unabhängig vom Einfluss des CA125 Moleküls scheinen die hier erhobenen Daten kein stringentes Bild in Bezug auf Tumorstammzellmarker zur Detektion von Tumorstammzellen zu geben. Ein ähnlich kontroverses Bild zeigt sich auch in den Forschungsergebnissen der aktuellen Literatur. Auch hier gehen die Meinungen über die Expression der Tumorstammzellmarker auseinander. Meng und Kollegen konnten zeigen, dass die Höhe des CD44⁺/CD24⁻ Zellanteils in Ovarialkarzinomen scheinbar mit der Aggressivität des jeweiligen Tumors korreliert. CD44⁺/CD24⁻ Zellen zeigen dabei ein fortgeschrittenes Differenzierungspotenzial, eine erhöhte Invasionstendenz sowie eine signifikante Chemoresistenz gegenüber den herkömmlichen Chemotherapeutika. Patienten zeigen dabei ein schlechtes medianes Überleben (Meng et al., 2012). Im Gegensatz dazu weisen Wang und Kollegen eine signifikante Korrelation einer CD24-Überexpression, also CD24⁺ Zellen, mit einer schlechten Überlebensrate nach (Z. Wang, Wang, Wang, Wang, & Chen, 2016). Auch Gao und Kollegen schließen sich dieser Meinung an und bringen eine CD24-Überexpression mit Tumorstammzeleigenschaften wie Chemoresistenz in Verbindung (Gao, Choi, Kang, Youn, & Cho, 2010).

5.2.3 CD133 und CD117

Eine erhöhte Expression von CD133 und CD117 ist laut Literatur charakteristisch für Tumorstammzellen. Demnach scheinen die beiden Zelllinien dieser Arbeit mit einer sehr geringen Expression dieser Marker eher keinen Tumorstammzellcharakter zu besitzen.

Bezüglich der Tumorstammzellmarker CD133 und CD117 konnte kein Zusammenhang mit der CA125 Expression hergestellt werden. Zudem ergab sich kein Unterschied zwischen den Zelllinien, wobei beide eine sehr geringe Expression der Marker zeigten.

Auch bezüglich CD133 sind in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse zu finden. Während viele Publikationen in CD133⁺ Zellen Stammzeleigenschaften nachweisen können (Bao et al., 2006; Singh et al., 2004), belegen fast ebenso viele Arbeitsgruppen genau das Gegenteil. So wird berichtet, dass auch CD133⁻ Zellen sowohl in vitro also auch in vivo Stammzellcharakter besitzen (Beier et al., 2007; J. Wang et al., 2008). Ferner berichten Shmelkov und Kollegen, dass CD133⁻ Kolonkarzinomzellen im Rahmen von Metastasierung im Vergleich mit CD133⁺ Zellen ein aggressiveres Wachstum und eine markante Stammzellcharakteristik aufweisen (Shmelkov et al., 2008). Im Gegensatz zu CD133 wird eine CD117-Überexpression in der Literatur einstimmig mit dem Auftreten von Tumorstammzeleigenschaften in Verbindung gebracht. Bapat und Kollegen isolierten Tumorzellen aus dem Aszites von Patientinnen, die an einem Ovarialkarzinom erkrankt waren und konnten in diesen Zellen eine erhöhte Expression von CD117 feststellen (Bapat et al., 2005). Eine weitere Arbeitsgruppe analysierte in Sphäroiden generierte, chemoresistente Zellen aus dem Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und fanden auch hier eine erhöhte CD117-Expression (Zhang et al., 2008). Die Expression von CD117 war in dieser Arbeit sehr gering. Unter der Annahme, es handelt sich bei den hier verwendeten Zellen um Tumorstammzellen, korrelieren die vorliegenden Daten folglich nicht mit den Ergebnissen der Literatur.

5.2.4 Fazit der Tumorstammzellmarker

Das Tumorstammzellmodell bietet eine attraktive Erklärung für die funktionelle Heterogenität solider Tumore, wie zum Beispiel Unterschiede in der Proliferation und des Differenzierungspotentials. Diese Unterschiede könnten demzufolge mit der parallelen Entwicklung unterschiedlicher Tumorstammzellen innerhalb eines Tumors erklärbar sein. Dabei könnten Tumorstammzellen reversiblen phänotypischen Veränderungen unterliegen (Burgos-Ojeda, Rueda, & Buckanovich, 2012; Visvader & Lindeman, 2012). Auch Meyer und Kollegen berichten von unterschiedlichen Tumorstammzell-Populationen innerhalb eines Tumors, die eine phänotypische und funktionelle Heterogenität in Ovarialkarzinomen zu belegen scheinen (M. J. Meyer et al., 2010).

Somit kann in einzelnen Zelllinien von unterschiedlichen Anteilen an Tumorstammzellen ausgegangen werden, was sich folglich auch in der Höhe der Tumorstammzellmarkerexpression widerspiegelt.

Die Markerwerte für CD24, CD44 schwanken stark zwischen den beiden Zelllinien und unterstreichen damit die hohe Heterogenität des Ovarialkarzinoms. Silva und Kollegen publizieren ebenfalls stark variierende Werte für CD24 und CD44. Des Weiteren stellt sich in dieser Arbeitsgruppe auch der Marker CD133 als sehr heterogen in seiner Expressionsrate in unterschiedlichen Proben dar (Silva et al., 2011). CD133 und CD177 wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings mit unter 2 % für alle Klone in beiden Zelllinien gleich niedrig exprimiert. Dass nicht alle Tumorstammzellmarker innerhalb einer Zelllinie exprimiert werden, erscheint mit Anlehnung an die Arbeit von Burgos-Ojeda und der hohen Heterogenität der Tumorzellen und Tumorstammzellen als plausibel (Burgos-Ojeda et al., 2012). Außerdem wird CD133, laut Baba und Kollegen, nur in ~ 40 % der Krebszelllinien des Ovars exprimiert und nur in ~ 30 % der ovarialen Primärtumore (Baba et al., 2009).

Allerdings bleibt hier nicht außer Acht zu lassen, dass es sich bei den Zelllinien OAWH8⁺ und OAWB8⁻ streng genommen nicht um zwei unterschiedliche Zelllinien handelt, sondern um zwei Subklone aus ein und derselben Zelllinie, die sich in der Höhe der jeweiligen CA125 Expressivität unterscheiden. Insofern könnte das divergente Verhalten der Tumorstammzellmarkerexpression auch mit Funktionsunterschieden im jeweiligen CA125 Molekül zu erklären sein.

Unabhängig davon ist den Ergebnissen dieser Arbeit im Zusammenspiel mit den Ergebnissen aus der aktuellen Literatur kein stringenter Zusammenhang zwischen CA125 und dem Tumorstammzellanteil zu entnehmen. Diese Interpretation ist jedoch unter Vorbehalt zu betrachten, da fraglich bleibt, ob die hier verwendeten Tumorstammzellmarker tatsächlich optimal zur Detektion von Tumorstammzellen geeignet sind.

Im Folgenden wird in dieser Arbeit daher die CA125 Expression in Bezug auf die typischen Tumorstammzeleigenschaften, wie Chemoresistenz und die Fähigkeit der Zellen zur Sphäroidbildung, untersucht.

5.3 Chemosensitivitätsbestimmung nach Monolayerkultur

In der Literatur werden onkogene Muzine häufig mit einer gesteigerten Expression von Multidrugresistenzmarkern und mit Tumorstammzellcharakter in Verbindung gebracht. Sie könnten daher eine wertvolle Strategie für die Bekämpfung von Tumorchemoresistenzen bieten (Jonckheere, Skrypek, & Van Seuning, 2014). In dieser Arbeit soll deshalb der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss CA125 (MUC16) auf die Chemosensibilität von Ovarialkarzinomzellen besitzt.

5.3.1 Die Wahl der Chemoreagenzien

Die aktuelle Standardtherapie beinhaltet 6 Zyklen Carboplatin, in fortgeschrittenen Stadien in Kombination mit Paclitaxel, wobei Dosis und Dauer der Infusion sowie die Anzahl der Zyklen in den einzelnen Behandlungszentren variiert (Covens et al., 2002).

Paclitaxel ist ein vielfach verwendetes Zytostatikum, das zur first-line bzw. second-line Therapie bei Ovarialkarzinomen, Mammakarzinomen sowie Bronchialkarzinomen Anwendung findet und aus der Gruppe der Taxane stammt. Paclitaxel wirkt über eine Hemmung der Depolarisation der Mikrotubuli und führt somit letztendlich zum Zelltod mittels Apoptose. Carboplatin hingegen bewirkt als genotoxisches Therapeutikum einen DNA-Schaden in der Tumorzelle, der ebenfalls zum Zelltod führt (Boivin, Lane, Piché, & Rancourt, 2009). Neben Carboplatin ist auch Cisplatin ein vielfach verwendetes platinum-enthaltendes, genotoxisches Chemotherapeutikum für Ovarialkarzinome. In der Literatur wird Cisplatin häufig als Chemotherapeutikum der Wahl in Verbindung mit der Untersuchung von Chemosensibilität in Ovarialtumorzellen verwendet. Unterschiede zwischen Cisplatin und Carboplatin ergeben sich u.a. aus ihrer Kinetik. Carboplatin ist dabei auf molarer Ebene um ein Vielfaches weniger zytotoxisch als Cisplatin. Trotz dieses Unterschieds zeigen Versuche an menschlichen Xenografttumoren bei bioäquivalenten Dosierungen eine vergleichbare antineoplastische Wirksamkeit beider Chemotherapeutika. Hieraus ergibt sich eine deutlich höhere Anzahl an Nebenwirkungen bei Cisplatin, dessen verminderte Tumorselektivität nephrotoxische, hepatotoxische und kardiotoxische Effekte verursachen kann. Auch emetische, neurotoxische sowie ototoxische Nebenwirkungen sind vermehrt

bei der Cisplatintherapie zu beobachten (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Bezüglich der Effektivität und dem Überleben in der Monotherapie konnte kein Unterschied zwischen Carboplatin und Cisplatin ermittelt werden (Covens et al., 2002).

Die Wahl der Chemoreagenzien in dieser Arbeit fiel daher auf Carboplatin und Paclitaxel, nicht auf Cisplatin, da auch im klinischen Alltag eher das besser verträgliche Carboplatin verwendet wird.

5.3.2 CA125 und die Chemoresistenz

Die Vitalitätsbestimmung der Zelllinie OAWH8⁺ zeigt in dieser Arbeit eine deutlich höhere Carboplatinresistenz der NC-Klone gegenüber den CA125⁻ Knockdownklonen. Die Zelllinie OAWB8⁻ zeigt auf Carboplatin ein ebenso ausgeprägtes, aber divergentes Verhalten der Klone. Die Wirkung von Paclitaxel zeigt hingegen zwischen den Klonen beider Zelllinien keinen wesentlichen Unterschied.

Der unterschiedliche Einfluss von CA125 auf Carboplatin und Paclitaxel könnte mit der jeweiligen Wirkweise der Chemotherapeutika erklärbar sein. Die Wirkung von Cisplatin beruht auf der Hemmung der DNA-Replikation durch Bildung von Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen, wodurch die Apoptose eingeleitet wird. Hieraus könnte man schlussfolgern, dass die Beeinflussung der Carboplatinresistenz durch CA125 möglicherweise durch die Hemmung der Apoptose erfolgt. Im Gegensatz dazu hemmt Paclitaxel die Zellteilung, indem es die Depolarisation der Mikrotubuli stört. In diesen Mechanismus kann CA125 offenbar nicht effizient eingreifen.

Die Ergebnisse der Chemosensibilitätsassays für OAWH8⁺ decken sich mit den Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppe Boivin, die in ihrer Arbeit zeigen, dass die Ausschaltung von CA125 die IC₅₀ bei Cisplatin um das 5-fache senkt, die Zelle also sensibler gegenüber Cisplatin macht. Dieser Effekt konnte nur für Cisplatin, nicht aber für Paclitaxel gezeigt werden. Damit scheint CA125 die Cisplatinresistenz zu fördern. Die Sensitivität gegenüber anderen genotoxischen Therapeutika (u.a. Cyclophosphamid, Doxorubicin) war ebenfalls herabgesetzt (Boivin et al., 2009). Dass die in dieser Arbeit ermittelte Carboplatinresistenz bei

den CA125⁻ Knockdownklonen der Zelllinie OAW H8⁺ nur um ~ 40 % vermindert ist, könnte damit zusammenhängen, dass Boivin und Kollegen in ihrer Arbeit eine andere Zelllinie (NIH:OVCAR3) sowie eine andere Methode zur Generierung der CA125⁻ Knockdownklone verwendet haben. Der Knockdown der CA125 Oberflächenexpression wurde hier durch single chain Antikörper (scFv) erreicht, die auf das endoplasmatische Retikulum gerichtet waren.

In der Literatur finden sich noch weitere Arbeitsgruppen, die ebenfalls den Einfluss eines Knockdowns unterschiedlicher Muzine in Tumorzellen bezüglich ihres Chemoresistenzverhaltens untersucht haben. So können Ren und Kollegen zum Beispiel zeigen, dass eine MUC1-Überexpression zu einer vermehrten Resistenz gegenüber genotoxischen Medikamenten führt und dass dagegen die Ausschaltung von MUC1 die Zellen gegenüber medikamenteninduzierter Apoptose sensitiviert (Ren et al., 2004).

Auch Kharbanda und Kollegen konnten herausfinden, dass die Ausschaltung der c-terminalen Untereinheit von MUC1 in ErbB2-überexprimierten Brustkrebszellen die Chemoresistenz gegenüber Trastuzumab, Tamoxifen, Taxol und Doxorubicin aufheben kann (Kharbanda, Rajabi, Jin, Raina, & Kufe, 2013; Raina et al., 2014; Uchida, Raina, Kharbanda, & Kufe, 2013). Die Ausschaltung von MUC1 in Blasenkrebszellen führt außerdem zu einer Volumenabnahme des Tumors in vivo. Der Einfluss des Muzins auf die Chemosensitivität ist auch in diesem Fall bewiesen (Fujii, Shimada, Anai, Fujimoto, & Konishi, 2013).

Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass in der CA125 Ausschaltung eine alternative therapeutische Strategie besteht, die epitheliale Ovarialkarzinomzellen gegenüber genotoxischen Medikamenten sensibilisiert und somit einen möglichen selektiven Vorteil für die chemotherapeutische Behandlung mit sich bringt.

Für die Zelllinie OAWB8⁻ wurde hingegen ein gegenteiliges Verhalten der Chemosensibilität nach CA125 Knockdown beobachtet. Eine Erhöhung der Sensibilität auf Chemotherapeutika nach CA125 Knockdown, wie es in dieser Arbeit für die Zelllinie OAWB8⁻ beobachtet wurde, konnte bis dato noch in keiner anderen Arbeitsgruppe festgestellt werden. Das divergente Verhalten der Zelllinien OAWH8⁺ und OAWB8⁻ zieht sich bisher durch fast alle Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden. Im Folgenden soll nun näher darauf eingegangen werden, woher die Divergenz der beiden Subklone herrühren könnte.

5.3.3 Das divergente Verhalten von OAWH8⁺ und OAWB8⁻

Die genaue Molekülstruktur von CA125, wie zum Beispiel die Anzahl bestimmter Domänen und Tandem-Repeats, ist bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt. So bleibt letztendlich die Frage offen, ob verschiedene CA125 Isoformen mit unterschiedlicher Molekülgröße existieren. In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben über die Molekülmasse von CA125 von 55 bis 1000 kDA. Es wird spekuliert, ob es sich dabei vielleicht um verschiedene Spleißvarianten von CA125 handeln könnte und dies die Erklärung dafür liefert, warum der Knockdown auch in dieser Arbeit die stark CA125⁺ Zellreihe sensibler gegenüber Chemotherapeutika macht, hingegen er bei der nur schwach CA125-exprimierten Zellreihe das Gegenteil bewirkt (Haridas et al., 2014).

Schon zuvor wurde der Einfluss einer CA125 Ausschaltung in Bezug auf Wachstumseigenschaften von Ovarialkarzinomzellen der Zelllinien OAWH8⁺ und OAWB8⁻ untersucht. Auch hierbei kamen zwischen den beiden Zelllinien divergente Ergebnisse heraus. In der Arbeit von Reinartz und Kollegen wurde in diesem Rahmen der maligne Phänotyp in Bezug auf Koloniebildung, Zelladhäsion, Migration und Invasion der beiden Zelllinien untersucht. Während es bei der weniger stark CA125⁺ Zelllinie OAWB8⁻ nach stabilem Knockdown zu einer erheblichen Hemmung der Koloniebildung, Zelladhäsion, Migration und Invasionsfähigkeit der CA125⁻ Knockdownklone kam, zeigten die Zellen der stark CA125⁺ Zelllinie OAWH8⁺ von Anfang an einen recht unbeweglichen, nicht invasiven Phänotyp, der sich auch durch den CA125 Knockdown in keiner Weise beeinflussen lässt (Reinartz et al., 2012). Der divergente Effekt des CA125 Knockdowns der OAWH8⁺ und der OAWB8⁻ Zelllinie bezüglich des Invasionspotentials ist hier damit erklärt, dass die Zellen unterschiedliche CA125 Isoformen mit divergenten Funktionseigenschaften exprimieren. Eine unterschiedliche CA125 Molekülstruktur könnte somit eine Erklärung dafür sein, warum der Knockdown auch in dieser Arbeit die stark CA125⁺ Zellreihe sensibler gegenüber Chemotherapeutika macht, hingegen er bei der nur schwach CA125-exprimierten Zellreihe das Gegenteil bewirkt.

5.3.4 Die Kombinationstherapie und der Synergismuseffekt

Die Chemotherapeutika wurden in dieser Arbeit sowohl als Monotherapie als auch in Kombinationstherapie untersucht. Letzteres galt dem Zweck, einen möglichen Synergismuseffekt nachzuweisen, der sich durch die gleichzeitige Wirkung beider Chemotherapeutika einstellen könnte. Von Synergie spricht man in der Pharmakologie, wenn zwei gleichzeitig eingenommene Medikamente ihre Wirkung gegenseitig verstärken.

Ein Synergismuseffekt auf die Vitalität der OAWB8⁻ NC-Zellen und der OAWB8⁻ CA125⁻ Knockdownzellen kann bei der Kombination der Chemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel nur bedingt beobachtet werden. Bereits bei der ersten Zugabe der Kombinationstherapie wird die IC₅₀ bei beiden Zellklonen unterschritten, was man auf einen möglichen Synergismuseffekt rückführen könnte. Methodisch ist diese Interpretation allerdings unter Vorbehalt zu betrachten, da für ein eindeutigeres Ergebnis in einem optimaleren Konzentrationsbereich mit niedrigeren Konzentrationen gearbeitet werden müsste. Bei weiterer Erhöhung der Paclitaxelkonzentration ist nur bei den OAWB8⁻ Zellen eine weitere Reduktion der Zellvitalität sichtbar, ein Synergismuseffekt kann hierbei nicht mehr beobachtet werden.

Ein Synergismuseffekt auf die Vitalität der OAWH8⁺ Zellen kann bei der Kombination der Chemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel nicht beobachtet werden.

Eine Arbeitsgruppe konnte bereits demonstrieren, dass die Kombination von Carboplatin, Paclitaxel zusammen mit Nobiletin, einem pflanzlichen Stoff, einen synergistischen Effekt gegen die Proliferation von Lungenkarzinomzellen generiert. Dabei war Paclitaxel für den synergistischen Effekt verantwortlich (Uesato et al., 2014). Weiterhin findet man in der Literatur viele Arbeiten, die den Effekt von Carboplatin und Paclitaxel zusammen mit einem dritten Wirkstoff untersuchen. Ergebnisse, welche die isolierte Kombination von Paclitaxel und Carboplatin auf einen synergistischen Effekt untersuchen, sind dagegen selten. Feng und Kollegen versuchen in ihrer Arbeit einen möglichen Synergismuseffekt für die Kombination von Doxorubicin und Paclitaxel in Bezug auf die Behandlung

von metastasiertem Lungenkrebs zu demonstrieren. Dabei zeigt sich, dass das Verhältnis der Konzentrationen beider Chemotherapeutika eine große Bedeutung für die Effektivität der Behandlung hat. Bei einem Verhältnis von Doxorubicin und Paclitaxel von 5:1 kann ein großer Synergismuseffekt beobachtet werden. Dreht man das Verhältnis der beiden Therapeutika um, ist hingegen ein antagonistischer Effekt zu beobachten (Feng et al., 2014).

Um eine Aussage über einen möglichen synergistischen Effekt von Carboplatin und Paclitaxel treffen zu können, müsste wahrscheinlich unter anderem das Verhältnis der beiden Therapeutika variiert werden, um zu sehen, ob unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse einen Effekt zeigen. Dies gilt es in zukünftigen Versuchen näher zu untersuchen.

5.4 Sphäroide

Die Bildung von Sphäroiden, gehört unter anderem zu den Stammzeleigenschaften von Tumorzellen. Für die Kultivierung wurde serumfreies Sphäroidmedium verwendet, nachdem es unter dem RPMI-Standardmedium zu keiner Sphäroidbildung kam.

In Kryczeks Arbeit kann gezeigt werden, dass bei mehrmaligem Passagieren der Zellen, die Expression von Tumorstammzellmarkern (CD24, CD44, CD133, CD117, ALDH) stetig verringert wird (Kryczek et al., 2012). Diese Beobachtung kann von Lee und Kollegen unterstützt werden, die aufzeigen, dass Tumorzellen unter in vitro Serum-Standard-Kulturbedingungen ihre Tumorstammzellen verlieren. Dies zeigt, dass der Stammzellphänotyp höchstwahrscheinlich von einem in vivo Tumormikroumfeld unterstützt wird, das in Standard in vitro Bedingungen nicht angemessen imitiert werden kann (Lee et al., 2006). Unterstützt wird diese Beobachtung wiederum von Kryczek und Kollegen, die in ihrer Arbeit herausfinden, dass die Tumorzellen, die unter in vitro Bedingungen weniger Tumorstammzellmarker produzieren und daraufhin in ein serumfreies Medium umpassagiert werden, kurze Zeit später erneut vermehrt Tumorstammzellmarker exprimieren (Kryczek et al., 2012). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Zellen beider Zelllinien in dieser Arbeit im serumfreien Sphäroidmedium besser bzw. überhaupt erst Sphäroide bilden.

5.4.1 Sphäroidbildung

In der Zelllinie OAWB8⁻ besitzt nur der CA125⁻ Knockdownklon die Fähigkeit zur Sphäroidbildung, wohingegen der NC Klon unter keinen Kulturbedingungen Sphäroide bildet. In der stark CA125⁺ Zelllinie kann in der Zelllinie OAWH8⁺ dagegen bei beiden Klonen eine Sphäroidbildung beobachtet werden, wobei die Sphäroide bei dem CA125⁺ NC Klon dichter und größer ausfallen. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Sphäroidbildungsverhalten zwischen den beiden Zelllinien könnte die große glykosylierte extrazelluläre Domäne des CA125 Gens darstellen, das als zusätzliche Bindungsmöglichkeit zwischen den Tumorzellen fungieren könnte. Somit fördert CA125 die Bildung von Sphäroiden. Dies erklärt, warum die stark CA125⁺ Zelllinie OAWH8⁺ ein besseres Sphäroidwachstum aufweist. Allerdings trifft diese Theorie nur bedingt auf die OAWB8⁻ Zelllinie zu, da hier der CA125⁻ Knockdownklon im Gegensatz zu seiner CA125⁺ Kontrolle tendenziell besser in der Lage ist Sphäroide zu bilden. Hier ist allerdings nicht außer Acht zu lassen, dass die Expression von CA125 auch bei dem CA125⁺ NC Klon sehr gering ausfällt und dass ein divergentes Verhalten von OAWH8⁺ und OAWB8⁻ schon in vorherigen Versuchen immer wieder aufgefallen ist.

Des Weiteren konnten Shimizu und Kollegen in ihrer Arbeit bereits feststellen, dass im Pankreaskarzinom eine Bindung von Mesothelin an CA125 und somit auch ein größeres Invasions- und Migrationspotenzial existiert (Shimizu et al., 2012). Da Mesothelin ebenfalls in den Tumorzellen des Ovarialkarzinoms überexprimiert wird (Hellstrom & Hellstrom, 2011), könnte dies einerseits eine Erklärung für die hohe Fähigkeit zur Sphäroidbildung in den Zellen der stark CA125⁺ OAWH8⁺ Zelllinie sein und andererseits erklären, warum die Sphäroidbildung in der Zelllinie OAWB8⁻, die weitaus weniger CA125 produziert, schwächer ausfällt.

5.4.2 Chemosensitivitätsbestimmung nach Sphäroidkultur

Durch direkten, dreidimensionalen Kontakt der Zellen im Sphäroid wird den Zellen offenbar ein Umfeld geboten, welches dem in vivo-Zustand nahe kommt und die Sensitivität unter anderem gegenüber Chemotherapeutika beeinflusst.

Betrachtet man die Chemosensitivität von Sphäroidzellen nach CA125 Knockdown so gilt besonders für die Zelllinie OAWH8⁺ und angedeutet auch für die Zelllinie OAWB8⁻, dass der Knockdownklon sensitiver gegenüber der Chemotherapie ist. Ähnlich wie bei der Monolayerkultur der Zelllinie OAWH8⁺ scheint CA125 die Chemoresistenz zu begünstigen.

Bei den CA125⁻ Zellen beider Zelllinien dieser Arbeit führt die Sphäroidbildung zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Carboplatin im Vergleich zu den Zellen in Monolayerkultur.

CA125⁺ NC Zellen zeigen hingegen keine gesteigerte Carboplatinresistenz nach Sphäroidkultur und somit auch keinen größeren Tumorstammzellcharakter, was evtl. durch die schon von Beginn an hohe Carboplatinresistenz der Zellen begründet werden könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit den Forschungsergebnissen von He und Kollegen, die in ihrer Arbeit bereits zeigen konnten, dass Sphäroidzellen im Vergleich zu adhärenenten Zellen ebenfalls eine größere Resistenz gegenüber Cisplatin zeigen (He et al., 2014). Auch bei Primärzellen zeigte sich in non-adhärenenten Zellen eine höhere Cisplatinresistenz als bei adhärenenten Zellen (Latifi et al., 2012). Sphäroidzellen zeigten auch bei L'Espérance und Kollegen im Vergleich zu einschichtigen, adhärenenten Ovarialtumorzellen eine verminderte Apoptoserate und eine höhere Chemoresistenz nach Behandlung mit Cisplatin (L'Espérance et al., 2008; Makhija et al., 1999). Sutherland und Kollegen begründen dies mit einer geringeren Proliferationsrate der Sphäroidzellen, die sie weniger angreifbar gegenüber zytotoxischen Substanzen macht (Sutherland & Durand, 1976).

Der Unterschied in der Chemosensitivität zwischen Sphäroidzellen und Monolayerzellen gegenüber Paclitaxel war in dieser Arbeit nicht so gravierend wie unter Behandlung mit Carboplatin.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Forschungsergebnissen von Makhija und Kollegen, die das Apoptoseverhalten von Sphäroidzellen im Vergleich zu Monolayerzellen unter Behandlung mit Cisplatin und Taxol untersuchen. Dabei kam heraus, dass Cisplatin in Monolayer- und Sphäroidzellen eine Apoptose

erzielen konnte, wobei in den Monolayerzellen eine 5-fache, in den Sphäroidzellen hingegen eine bis zu 3-fache Fragmentierung erreicht wurde. Bei Taxol kam es nur zu einer leichten Fragmentierung der Monolayerzellen, nicht aber der Sphäroidzellen (Makhija et al., 1999). Des Weiteren konnten Wang und Kollegen in ihrer Arbeit zeigen, dass in Sphäroidzellen im Vergleich zu naiven OVCAR-3 Zellen neben einem erhöhten invasiven Verhalten sowie einem größeren Migrationspotential auch ein höheres Resistenzverhalten gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika zu beobachten ist. Dabei zeigten die Zellen ein geringeres Ansprechen auf Docetaxel als auf Cisplatin. Es stellte sich heraus, dass die IC_{50} von Cisplatin bei naiven OVCAR-3 Zellen bei ca. 5 μM , die der Sphäroidzellen erst bei ca. 15 μM liegt. Ein geringeres Ansprechen zeigten die Zellen gegenüber Docetaxel. Hier lag die IC_{50} bei den naiven Zellen bei ca. 2 nM, die der Sphäroidzellen hingegen bei bis zu 7 nM (L. Wang, Mezencev, Bowen, Matyunina, & McDonald, 2012).

Die erhöhte Chemoresistenz von Sphäroidzellen gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika ist nur mit einem komplexen Zusammenspiel zu erklären, das multiple Mechanismen, wie Membrantransporter und gestörte Apoptosemechanismen, beinhaltet. Diese gilt es in zukünftigen Versuchen näher zu untersuchen.

5.5 Ausblick

Das Ovarialkarzinom ist geprägt durch eine aggressive Proliferation, eine hohe Metastasierungsrate sowie die Ausbildung einer zumeist im Verlauf auftretenden Resistenz gegenüber der herkömmlichen Standardchemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel. In dieser Arbeit konnte unter anderem ein Einfluss von CA125 auf die Chemoresistenz sowie die Bildung von Sphäroidzellen nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich Sphäroidzellen unabhängig ihrer Zelllinie als grundsätzlich resistenter gegenüber einer Chemotherapie als adhärente Zellen. Sphäroide, die frei im malignen Aszites schwimmen, können später die Oberfläche des Peritoneums befallen und Metastasen bilden. In zukünftigen Untersuchungen wäre es daher interessant herauszufinden, welchen Einfluss CA125 auf dieses Metastasierungspotential besitzt. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen

werden, ob in vivo Veränderungen der CA125 Expression sowie der Tumorstammzellanteile im Verlauf einer Ovarialkarzinomkrankung zu beobachten sind. Zu diesem Zweck bieten sich auch hier wieder die Untersuchung der Sphäroidzellen an, da ihre Entnahme im malignen Aszites zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wie zum Beispiel bei Erstdiagnose und im Falle des Auftretens eines Rezidivs, gut zugänglich und wenig invasiv erfolgen kann.

Weiterhin ist die Identifizierung weiterer Tumorstammzellmarker notwendig. Dabei müsste zum Beispiel auch in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass die Expression dieser Marker mit tumorinitiierenden Eigenschaften korreliert. Die zuverlässige Detektion von Tumorstammzellen würde die Erforschung ihrer physiologischen Eigenschaften sowie insbesondere ihrer Resistenzmechanismen ermöglichen und damit gleichzeitig ein neues Feld spezifischer Therapiestrategien eröffnen. In Ovarialkarzinomzelllinien zeigt der Tumorstammzellmarker LGR5 diesbezüglich bereits vielversprechende Ergebnisse. Seine Rolle in Bezug auf Tumorstammzellanteile in Ovarialkarzinomzellen näher zu erforschen, wäre daher für die Zukunft wünschenswert. Bis die spezifische Eradikation von Tumorstammzellen jedoch mit neuen Therapiestrategien, die zu einem Überlebensvorteil der Patienten führen, Einzug in die klinische Routine hält, bleibt es sicherlich noch ein langer Weg.

6 Zusammenfassung

6.1 Der Einfluss von CA125 auf Chemoresistenz, Sphäroidbildung und Tumorstammzellmarkerexpression in Ovarialkarzinomzellen

Das tumorassoziierte Antigen CA125 wird häufig zur Verlaufskontrolle von Patientinnen mit Ovarialkarzinom angewendet, da es in Ovarialkarzinomzellen zumeist überexprimiert wird. Dabei ist die physiologische Funktion des Muzins bis heute weitgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, zu untersuchen, welchen Einfluss der Knockdown von CA125 in Ovarialkarzinomzellen auf die Chemosensibilität der Zellen, die Fähigkeit zu Sphäroidbildung sowie auf die Expression von Tumorstammzellmarkern besitzt. Zu diesem Zweck wurden zwei Subklone der Zelllinie OAW42 verwendet, deren CA125-Expression mittels stabiler Transfektion signifikant gehemmt wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die adhärenenten Zellen der Zelllinie OAWH8⁺ durch den CA125 Knockdown eine signifikant höhere Carboplatinresistenz besitzen, wohingegen die Paclitaxelresistenz durch die CA125 Expression unbeeinflusst bleibt. In der Zelllinie OAWB8⁻ hingegen bewirkte der CA125 Knockdown einen gegenteiligen Effekt bezüglich der Carboplatinresistenz, so dass der CA125 Knockdown hier zu einer Erhöhung der Carboplatinsensibilität führte. Gegenüber Paclitaxel hatte CA125 wiederum keinen markanten Einfluss.

Weiterhin wurde der Einfluss des CA125 Knockdowns auf die Expression von Tumorstammzellmarkern untersucht, wobei sich bei den Versuchen dieser Arbeit kein Zusammenhang nachweisen lässt.

Zudem verstärkte die CA125 Expression die homotypische Interaktion der OAWB8⁻ Zellen, sodass CA125⁺ Zellen eine stärkere Sphäroidbildung zeigten als die CA125⁻ Knockdownklone. Für die Zelllinie OAWB8⁻ zeigte hingegen nur der CA125⁻ OAWB8⁻ Knockdownklon die Fähigkeit zur Sphäroidbildung.

Zusammenfassend konnte für beide Zelllinien beobachtet werden, dass die Zellen in Sphäroidkultur eine deutlichere Resistenz gegenüber Carboplatin und Paclitaxel aufwiesen, als die adhärenenten Kontrollzellen.

Besonders in der Sekundärtherapie des Ovarialkarzinoms sind Chemoresistenzen weit verbreitet. Dabei scheint CA125 eine zentrale Rolle für das Überleben von Ovarialkarzinomzellen einzunehmen. Mit welchem Mechanismus und über welche Signalmoleküle CA125 die Chemoresistenz beeinflusst, sollte daher weiter erforscht werden, um langfristig einen neuen Therapieansatz für eine kurative Therapie des Ovarialkarzinoms zu etablieren. Generell bedarf es zur Entwicklung weiterer Therapieoptionen einer umfangreichen Erforschung der physiologischen Funktion von CA125. Des Weiteren bleibt die Detektion optimaler Tumorstammzellmarker für Ovarialkarzinomzellen zu eruieren, um Tumorstammzellen effektiv identifizieren zu können. Dabei sollte in Zukunft insbesondere der Frage nachgegangen werden, ob sich im Verlauf einer Ovarialkarzinomkrankung auch in vivo eine Veränderung der CA125 Expression sowie der Tumorstammzellanteile beobachten lässt. Hierfür würde sich besonders die Entnahme von Sphäroidzellen im Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen nach Erstdiagnose sowie gegebenenfalls bei Auftreten eines Rezidivs eignen.

6.2 The influence of CA125 on chemosensitivity, sphere formation and cancer stem cell markers in ovarian cancer cells

Since the tumor associated antigen CA125 is commonly highly expressed in ovarian cancer cells, it is frequently used to monitor patients with ovarian cancer. To this day, the physiological role of this mucin is largely unknown. Therefore it is the aim of the present study to investigate the impact of CA125 gene silencing in ovarian cancer cells on its chemosensitivity, its ability to form spheres as well as on the expression of tumor stem cell markers. For this purpose, two subclones of the OAW42 cell line were used whose CA125 expression is significantly inhibited by means of stable transfection.

In the present research study it was shown that adherent cells of the OAWH8⁺ cell line displayed a significantly higher carboplatin resistance, whereas paclitaxel resistance was unaffected by CA125 expression. In contrast, the OAWB8⁻ cell line showed a divergent effect on carboplatin resistance. Here, CA125 gene silencing

caused an increase of carboplatin sensitivity whereas it did not show any distinctive influence on paclitaxel.

Furthermore the influence of CA125 gene silencing on the expression of cancer stem cell markers was investigated, but during the present studies no prove of any correlation could be found.

Moreover CA125 expression increased the interaction between OAWB8⁻ cells so that CA125⁺ cells showed an enhanced sphere formation compared to CA125⁻ clones. With regard to the OAWB8⁻ cell line, only the CA125⁻ clone showed the ability to form spheres. In summary, for both cell lines it was observed that sphere forming cells showed an enhanced and significant resistance to carboplatin and paclitaxel compared to adherent cells.

Especially in second line treatment of ovarian cancer chemoresistance is widespread. Moreover it seems that CA125 plays a central role in the survival of ovarian cancer cells.

To establish new therapeutic approaches for curative therapy of ovarian cancer it should be further explored what mechanism and via which signaling pathways CA125 affects chemoresistance. Generally, extensive research on the physiological function of CA125 is necessary to develop new therapeutic options. In order to effectively identify tumor stem cells it furthermore remains to elicit ideal tumor stem cell markers.

In the future, attention should particularly be focused on the question whether there is a change in CA125 expression in vivo and tumor stem cell properties in process of ovarian cancer. For this purpose, the withdrawal of sphere cells in ascites of ovarian cancer patients at initial diagnosis and in case of recidivation could be one methodic option.

7 Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Schwartz, H., & Kemler, R. (1996). Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(4), 514–23. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19960616)61:4<514::AID-JCB4>3.0.CO;2-R
- Andersen, M. R., Goff, B. A., Lowe, K. A., Scholler, N., Bergan, L., Drescher, C. W., ... Urban, N. (2008). Combining a symptoms index with CA 125 to improve detection of ovarian cancer. *Cancer*, 113(3), 484–9. doi:10.1002/cncr.23577
- Ashworth, A. (2008). A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(22), 3785–90. doi:10.1200/JCO.2008.16.0812
- Audeh, M. W., Carmichael, J., Penson, R. T., Friedlander, M., Powell, B., Bell-McGuinn, K. M., ... Tutt, A. (2010). Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*, 376(9737), 245–51. doi:10.1016/S0140-6736(10)60893-8
- Baba, T., Convery, P. a, Matsumura, N., Whitaker, R. S., Kondoh, E., Perry, T., ... Murphy, S. K. (2009). Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. *Oncogene*, 28(2), 209–18. doi:10.1038/onc.2008.374
- Banerjee, S., & Kaye, S. (2011). The role of targeted therapy in ovarian cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 47 Suppl 3, S116–30. doi:10.1016/S0959-8049(11)70155-1
- Banerjee, S., & Kaye, S. B. (2013). New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(5), 961–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2243
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., ... Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), 756–60. doi:10.1038/nature05236
- Bapat, S. A., Koppikar, C. B., & Kurrey, N. K. (2005). Stem and Progenitor-Like Cells Contribute to the Aggressive Behavior of Human Epithelial Ovarian Cancer Stem and Progenitor-Like Cells Contribute to the Aggressive Behavior of Human Epithelial Ovarian Cancer, 3025–3029.

- Barabé, F., Kennedy, J. a, Hope, K. J., & Dick, J. E. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5824), 600–4. doi:10.1126/science.1139851
- Bast, R. C., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L. M., Colvin, R. B., & Knapp, R. C. (1981). Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 68(5), 1331–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=370929&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bast, R. C., Klug, T. L., St John, E., Jenison, E., Niloff, J. M., Lazarus, H., ... Knapp, R. C. (1983). A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, 309(15), 883–7. doi:10.1056/NEJM198310133091503
- Bast, R. C., Xu, F. J., Yu, Y. H., Barnhill, S., Zhang, Z., & Mills, G. B. (1998). CA 125: the past and the future. *The International Journal of Biological Markers*, 13(4), 179–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228898>
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., ... Beier, C. P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Research*, 67(9), 4010–5. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4180
- Belisle, J. a, Horibata, S., Jennifer, G. a a, Petrie, S., Kapur, A., André, S., ... Patankar, M. S. (2010). Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. *Molecular Cancer*, 9, 118. doi:10.1186/1476-4598-9-118
- Berek, J., Taylor, P., McGuire, W., Smith, L. M., Schultes, B., & Nicodemus, C. F. (2009). Oregovomab maintenance monoimmunotherapy does not improve outcomes in advanced ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(3), 418–25. doi:10.1200/JCO.2008.17.8400
- Bian, C., Yao, K., Li, L., Yi, T., & Zhao, X. (2016). Primary debulking surgery vs. neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery for patients with advanced ovarian cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293(1), 163–8. doi:10.1007/s00404-015-3813-z
- Boivin, M., Lane, D., Piché, A., & Rancourt, C. (2009). CA125 (MUC16) tumor antigen selectively modulates the sensitivity of ovarian cancer cells to genotoxic drug-induced apoptosis. *Gynecologic Oncology*, 115(3), 407–13. doi:10.1016/j.ygyno.2009.08.007
- Boman, B. M., & Wicha, M. S. (2008). Cancer stem cells: a step toward the cure. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(17), 2795–9. doi:10.1200/JCO.2008.17.7436

- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212098>
- Bowman, A., Gabra, H., Langdon, S. P., Lessells, A., Stewart, M., Young, A., & Smyth, J. F. (2002). CA125 response is associated with estrogen receptor expression in a phase II trial of letrozole in ovarian cancer: identification of an endocrine-sensitive subgroup. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(7), 2233–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114425>
- Brewer, M. A., Johnson, K., Follen, M., Gershenson, D., & Bast, R. (2003). Prevention of Ovarian Cancer : Intraepithelial Neoplasia Prevention of Ovarian Cancer : Intraepithelial Neoplasia, 20–30.
- Bristow, R. E., & Chi, D. S. (2006). Platinum-based neoadjuvant chemotherapy and interval surgical cytoreduction for advanced ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, 103(3), 1070–6. doi:10.1016/j.ygyno.2006.06.025
- Brown, J. M., & Giaccia, A. J. (1998). The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Research*, 58(7), 1408–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537241>
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., ... Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913–7. doi:10.1038/nature03443
- Burges, A., & Schmalfeldt, B. (2011). Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, 108(38), 635–41. doi:10.3238/arztebl.2011.0635
- Burgos-Ojeda, D., Rueda, B. R., & Buckanovich, R. J. (2012). Ovarian cancer stem cell markers: prognostic and therapeutic implications. *Cancer Letters*, 322(1), 1–7. doi:10.1016/j.canlet.2012.02.002
- Buys, S. S., Partridge, E., Black, A., Johnson, C. C., Lamerato, L., Isaacs, C., ... Berg, C. D. (2011). Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 305(22), 2295–303. doi:10.1001/jama.2011.766
- Chang, B., Liu, G., Xue, F., Rosen, D. G., Xiao, L., Wang, X., & Liu, J. (2009). ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 22(6), 817–23. doi:10.1038/modpathol.2009.35
- Chiang, C. L.-L., Kandalaft, L. E., Tanyi, J., Hagemann, A. R., Motz, G. T., Svoronos, N., ... Coukos, G. (2013). A dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad

- antitumor immunity: from bench to bedside. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(17), 4801–15. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1185
- Climate, B., Dyck, V., Phylogenies, T. F., & Compare, E. P. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells, 432(November). doi:10.1038/nature03031.1.
- Constantinou, P. E., Danysh, B. P., Dharmaraj, N., & Carson, D. D. (2011). Transmembrane mucins as novel therapeutic targets. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 6(6), 835–848. doi:10.1586/eem.11.70
- Coosemans, A., Vergote, I., & Van Gool, S. W. (2013). Dendritic cell-based immunotherapy in ovarian cancer. *Oncoimmunology*, 2(12), e27059. doi:10.4161/onci.27059
- Covens, A., Carey, M., Bryson, P., Verma, S., Fung Kee Fung, M., & Johnston, M. (2002). Systematic review of first-line chemotherapy for newly diagnosed postoperative patients with stage II, III, or IV epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 85(1), 71–80. doi:10.1006/gyno.2001.6552
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740C, 364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- Dixon, S. C., Nagle, C. M., Thrift, A. P., Pharoah, P. D. P., Pearce, C. L., Zheng, W., ... Webb, P. M. (2016). Adult body mass index and risk of ovarian cancer by subtype: a Mendelian randomization study. *International Journal of Epidemiology*, 1–12. doi:10.1093/ije/dyw158
- Duffy, M. J. (2004). Evidence for the clinical use of tumour markers. *Annals of Clinical Biochemistry*, 41(Pt 5), 370–7. doi:10.1258/0004563041731529
- Duffy, M. J., Bonfrer, J. M., Kulpa, J., Rustin, G. J. S., Soletormos, G., Torre, G. C., ... Zwirner, M. (2005). CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use. *International Journal of Gynecological Cancer : Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 15(5), 679–91. doi:10.1111/j.1525-1438.2005.00130.x
- Fader, A. N., & Rose, P. G. (2007). Role of surgery in ovarian carcinoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(20), 2873–83. doi:10.1200/JCO.2007.11.0932
- Fargeas, C. A., Karbanová, J., Jászai, J., & Corbeil, D. (2011). CD133 and membrane microdomains: old facets for future hypotheses. *World Journal of Gastroenterology*, 17(36), 4149–52. doi:10.3748/wjg.v17.i36.4149
- Fedele, L., Arcaini, L., Vercellini, P., Marchini, M., Baglioni, A., & Bianchi, S. (1989). Serum Ca-125 concentrations in endometriosis. *Acta Europaea Fertilitatis*,

20(3), 137–9. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2533779>

- Fendrick, J. L., Konishi, I., Geary, S. M., Parmley, T. H., Quirk, J. G., & O'Brien, T. J. (1997). CA125 phosphorylation is associated with its secretion from the WISH human amnion cell line. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 18(5), 278–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276028>
- Feng, T., Tian, H., Xu, C., Lin, L., Xie, Z., Lam, M. H.-W., ... Chen, X. (2014). Synergistic co-delivery of doxorubicin and paclitaxel by porous PLGA microspheres for pulmonary inhalation treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* doi:10.1016/j.ejpb.2014.09.012
- Ferrandina, G., Ludovisi, M., Lorusso, D., Pignata, S., Breda, E., Savarese, A., ... Scambia, G. (2008). Phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in progressive or recurrent ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(6), 890–6. doi:10.1200/JCO.2007.13.6606
- Ferrero, J.-M., Weber, B., Geay, J.-F., Lepille, D., Orfeuvre, H., Combe, M., ... Pujade-Lauraine, E. (2007). Second-line chemotherapy with pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin is highly effective in patients with advanced ovarian cancer in late relapse: a GINECO phase II trial. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18(2), 263–8. doi:10.1093/annonc/mdl376
- Friedrich, J., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology*, 83(11-12), 849–71. doi:10.1080/09553000701727531
- Fujii, T., Shimada, K., Anai, S., Fujimoto, K., & Konishi, N. (2013). ALKBH2, a novel AlkB homologue, contributes to human bladder cancer progression by regulating MUC1 expression. *Cancer Science*, 104(3), 321–7. doi:10.1111/cas.12089
- Gao, M.-Q., Choi, Y.-P., Kang, S., Youn, J. H., & Cho, N.-H. (2010). CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene*, 29(18), 2672–80. doi:10.1038/onc.2010.35
- Giannakouros, P., Comamala, M., Matte, I., Rancourt, C., & Piché, A. (2015). MUC16 mucin (CA125) regulates the formation of multicellular aggregates by altering β -catenin signaling. *American Journal of Cancer Research*, 5(1), 219–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4300699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Goff, B. a, Mandel, L. S., Drescher, C. W., Urban, N., Gough, S., Schurman, K. M., ... Andersen, M. R. (2007). Development of an ovarian cancer symptom index:

- possibilities for earlier detection. *Cancer*, 109(2), 221–7.
doi:10.1002/cncr.22371
- Guppy, A. E., & Rustin, G. J. S. (2002). CA125 response: can it replace the traditional response criteria in ovarian cancer? *The Oncologist*, 7(5), 437–43.
doi:10.1634/theoncologist.7-5-437
- Haga, Y., Sakamoto, K., Egami, H., Yoshimura, R., & Akagi, M. (1986). Evaluation of serum CA125 values in healthy individuals and pregnant women. *The American Journal of the Medical Sciences*, 292(1), 25–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3521278>
- Haga, Y., Sakamoto, K., Egami, H., Yoshimura, R., Mori, K., & Akagi, M. (1986). Clinical significance of serum CA125 values in patients with cancers of the digestive system. *The American Journal of the Medical Sciences*, 292(1), 30–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3459357>
- Haridas, D., Ponnusamy, M. P., Chugh, S., Lakshmanan, I., Seshacharyulu, P., & Batra, S. K. (2014). MUC16: molecular analysis and its functional implications in benign and malignant conditions. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(10), 4183–99.
doi:10.1096/fj.14-257352
- Harter, P., Muallem, Z. M., Buhrmann, C., Lorenz, D., Kaub, C., Hils, R., ... du Bois, A. (2011). Impact of a structured quality management program on surgical outcome in primary advanced ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 121(3), 615–9. doi:10.1016/j.ygyno.2011.02.014
- He, Q.-Z., Luo, X.-Z., Wang, K., Zhou, Q., Ao, H., Yang, Y., ... Duan, T. (2014). Isolation and characterization of cancer stem cells from high-grade serous ovarian carcinomas. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 33(1), 173–84. doi:10.1159/000356660
- Hellstrom, I., & Hellstrom, K. E. (2011). fTwo novel biomarkers, mesothelin and HE4, for diagnosis of ovarian carcinoma. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 5(3), 227–240. doi:10.1517/17530059.2011.559459
- Hogg, R., & Friedlander, M. (2004). Biology of epithelial ovarian cancer: implications for screening women at high genetic risk. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(7), 1315–27. doi:10.1200/JCO.2004.07.179
- Huber, D., Cimorelli, V., Usel, M., Bouchardy, C., Rapiti, E., & Petignat, P. (2013). European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology How many ovarian cancer patients are eligible for fertility-sparing surgery ? *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 170(1), 270–274.
doi:10.1016/j.ejogrb.2013.06.039

- Jacobs, I., & Bast, R. C. (1989). The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 4(1), 1–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2651469>
- Jonckheere, N., Skrypek, N., & Van Seuningen, I. (2014). Mucins and tumor resistance to chemotherapeutic drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1846(1), 142–51. doi:10.1016/j.bbcan.2014.04.008
- Jones, R. J., Barber, J. P., Vala, M. S., Collector, M. I., Kaufmann, S. H., Ludeman, S. M., ... Hilton, J. (1995). Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood*, 85(10), 2742–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7742535>
- Kaatsch, P., Spix, C., & Hentschel, S. (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010*. (9. Auflage., p. 148). Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
- Kaye, S. B., Lubinski, J., Matulonis, U., Ang, J. E., Gourley, C., Karlan, B. Y., ... Kaufman, B. (2012). Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(4), 372–9. doi:10.1200/JCO.2011.36.9215
- Kenemans, P., Verstraeten, A. A., van Kamp, G. J., & von Mensdorff-Pouilly, S. (1995). The second generation CA 125 assays. *Annals of Medicine*, 27(1), 107–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7741988>
- Kharbanda, A., Rajabi, H., Jin, C., Raina, D., & Kufe, D. (2013). Oncogenic MUC1-C promotes tamoxifen resistance in human breast cancer. *Molecular Cancer Research : MCR*, 11(7), 714–23. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0668
- Kim, Y. J., Sauer, C., Testa, K., Wahl, J. K., Svoboda, R. a, Johnson, K. R., ... Knudsen, K. a. (2005). Modulating the strength of cadherin adhesion: evidence for a novel adhesion complex. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 17), 3883–94. doi:10.1242/jcs.02508
- Kinkel, K., Lu, Y., Mehdizade, A., Pelte, M.-F., & Hricak, H. (2005). Indeterminate ovarian mass at US: incremental value of second imaging test for characterization--meta-analysis and Bayesian analysis. *Radiology*, 236(1), 85–94. doi:10.1148/radiol.2361041618
- Kryczek, I., Liu, S., Roh, M., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., ... Zou, W. (2012). Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 130(1), 29–39. doi:10.1002/ijc.25967

- Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2010). The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American Journal of Surgical Pathology*, 34(3), 433–43. doi:10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79
- Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2011). Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Human Pathology*, 42(7), 918–31. doi:10.1016/j.humpath.2011.03.003
- L'Espérance, S., Bachvarova, M., Tetu, B., Mes-Masson, A.-M., & Bachvarov, D. (2008). Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids. *BMC Genomics*, 9, 99. doi:10.1186/1471-2164-9-99
- Lalwani, N., Prasad, S. R., Vikram, R., Shanbhogue, A. K., Huettner, P. C., & Fasih, N. (2011). Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. *Radiographics : A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 31(3), 625–46. doi:10.1148/rg.313105066
- Lam, S. S. N., Ip, C. K. M., Mak, A. S. C., & Wong, A. S. T. (2016). A novel p70 S6 kinase-microRNA biogenesis axis mediates multicellular spheroid formation in ovarian cancer progression. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.9345
- Lathia, J. D., Gallagher, J., Myers, J. T., Li, M., Vasanji, A., McLendon, R. E., ... Rich, J. N. (2011). Direct in vivo evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. *PloS One*, 6(9), e24807. doi:10.1371/journal.pone.0024807
- Latifi, A., Luwor, R. B., Bilandzic, M., Nazaretian, S., Stenvers, K., Pyman, J., ... Ahmed, N. (2012). Isolation and characterization of tumor cells from the ascites of ovarian cancer patients: molecular phenotype of chemoresistant ovarian tumors. *PloS One*, 7(10), e46858. doi:10.1371/journal.pone.0046858
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., ... Matulonis, U. (2014). Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, 15(8), 852–61. doi:10.1016/S1470-2045(14)70228-1
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., ... Fine, H. A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5), 391–403. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.030
- Liao, J., Qian, F., Tchabo, N., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Qian, Z., ... Odunsi, K. (2014). Ovarian Cancer Spheroid Cells with Stem Cell-Like Properties Contribute to Tumor Generation, Metastasis and Chemotherapy Resistance through Hypoxia-Resistant Metabolism. *PloS One*, 9(1), e84941. doi:10.1371/journal.pone.0084941

- Liu, Q., Cheng, Z., Luo, L., Yang, Y., Zhang, Z., Ma, H., ... Li, X. (2016). C-terminus of MUC16 activates Wnt signaling pathway through its interaction with β -catenin to promote tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.9191
- Liu, S., Liu, C., Min, X., Ji, Y., Wang, N., Liu, D., ... Li, K. (2013). Prognostic value of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase in ovarian cancer: a meta-analysis. *PloS One*, 8(11), e81050. doi:10.1371/journal.pone.0081050
- Lloyd, K. O., & Yin, B. W. (2001). Synthesis and secretion of the ovarian cancer antigen CA 125 by the human cancer cell line NIH:OVCAR-3. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 22(2), 77–82. doi:50600
- Lloyd, K. O., Yin, B. W., & Kudryashov, V. (1997). Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA 125 using a new monoclonal antibody (VK-8): identification as a mucin-type molecule. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 71(5), 842–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180155>
- Ma, L., Lai, D., Liu, T., Cheng, W., & Guo, L. (2010). Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(9), 593–602. doi:10.1093/abbs/gmq067
- Makhija, S., Taylor, D. D., Gibb, R. K., & Gerçel-Taylor, C. (1999). Taxol-induced bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids. *International Journal of Oncology*, 14(3), 515–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024685>
- Markman, M. (2001). Second-line therapy for potentially platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: what is optimal treatment? *Gynecologic Oncology*, 81(1), 1–2. doi:10.1006/gyno.2001.6162
- Meng, E., Long, B., Sullivan, P., McClellan, S., Finan, M. a, Reed, E., ... Rocconi, R. P. (2012). CD44+/CD24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival. *Clinical & Experimental Metastasis*, 29(8), 939–48. doi:10.1007/s10585-012-9482-4
- Meyer, M. J., Fleming, J. M., Lin, A. F., Hussnain, S. A., Ginsburg, E., & Vonderhaar, B. K. (2010). CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Research*, 70(11), 4624–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3619
- Meyer, T., & Rustin, G. J. (2000). Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 82(9), 1535–8. doi:10.1054/bjoc.2000.1174
- Moore, R. G., Brown, A. K., Miller, M. C., Skates, S., Allard, W. J., Verch, T., ... Bast, R. C. (2008). The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of

- ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology*, 108(2), 402–8. doi:10.1016/j.ygyno.2007.10.017
- Munroe, M., & Kolesar, J. (2016). Olaparib for the treatment of BRCA-mutated advanced ovarian cancer. *American Journal of Health-System Pharmacy : AJHP : Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 73(14), 1037–41. doi:10.2146/ajhp150550
- Nederman, T. (1984). Effects of vinblastine and 5-fluorouracil on human glioma and thyroid cancer cell monolayers and spheroids. *Cancer Research*, 44(1), 254–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6690037>
- O'Brien, T. J., Beard, J. B., Underwood, L. J., Dennis, R. A., Santin, A. D., & York, L. (2001). The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 22(6), 348–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11786729>
- O'Brien, T. J., Beard, J. B., Underwood, L. J., & Shigemasa, K. (2002). The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 23(3), 154–69. doi:64032
- Olive, P. L., & Durand, R. E. (1994). Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Reviews*, 13(2), 121–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923546>
- Paavonen, J., Miettinen, A., Heinonen, P. K., Aaran, R. K., Teisala, K., Aine, R., ... Lehtinen, M. (1989). Serum CA 125 in acute pelvic inflammatory disease. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 96(5), 574–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2604772>
- Pardal, R., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 3(12), 895–902. doi:10.1038/nrc1232
- Parmar, M. K. B., Ledermann, J. A., Colombo, N., du Bois, A., Delaloye, J.-F., Kristensen, G. B., ... Tropé, C. (2003). Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet*, 361(9375), 2099–106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826431>
- Partridge, E., Kreimer, A. R., Greenlee, R. T., Williams, C., Xu, J., Church, T. R., ... Buys, S. S. (2009). Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial. *Obstetrics and Gynecology*, 113(4), 775–82. doi:10.1097/AOG.0b013e31819cda77

- Pavlik, E. J., & van Nagell, J. R. (2013). Early detection of ovarian tumors using ultrasound. *Women's Health (London, England)*, 9(1), 39–55; quiz 56–7. doi:10.2217/whe.12.62
- Pittaway, D. E., & Fayez, J. A. (1987). Serum CA-125 antigen levels increase during menses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 156(1), 75–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3467595>
- Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(1), 33–45. doi:10.1038/nrm1004
- Prat, J. (2014). Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 124(1), 1–5. doi:10.1016/j.ijgo.2013.10.001
- Raina, D., Uchida, Y., Kharbanda, A., Rajabi, H., Panchamoorthy, G., Jin, C., ... Kufe, D. (2014). Targeting the MUC1-C oncoprotein downregulates HER2 activation and abrogates trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Oncogene*, 33(26), 3422–31. doi:10.1038/onc.2013.308
- Rao, B. R., & Slotman, B. J. (1991). Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer. *Endocrine Reviews*, 12(1), 14–26. doi:10.1210/edrv-12-1-14
- Rao, T. D., Tian, H., Ma, X., Yan, X., Thapi, S., Schultz, N., ... Spriggs, D. R. (2015). Expression of the Carboxy-Terminal Portion of MUC16/CA125 Induces Transformation and Tumor Invasion. *PloS One*, 10(5), e0126633. doi:10.1371/journal.pone.0126633
- Reinartz, S., Failer, S., Schuell, T., & Wagner, U. (2012). CA125 (MUC16) gene silencing suppresses growth properties of ovarian and breast cancer cells. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 48(10), 1558–69. doi:10.1016/j.ejca.2011.07.004
- Reinartz, S., Köhler, S., Schlebusch, H., Krista, K., Giffels, P., Renke, K., ... Wagner, U. (2004). Vaccination of patients with advanced ovarian carcinoma with the anti-idiotypic ACA125: immunological response and survival (phase Ib/II). *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(5), 1580–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15014007>
- Ren, J., Agata, N., Chen, D., Li, Y., Yu, W., Huang, L., ... Kufe, D. (2004). Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell*, 5(2), 163–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998492>
- Rump, A., Morikawa, Y., Tanaka, M., Minami, S., Umesaki, N., Takeuchi, M., & Miyajima, A. (2004). Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to

- mesothelin mediates cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9190–8. doi:10.1074/jbc.M312372200
- Rustin, G. J. S., van der Burg, M. E. L., Griffin, C. L., Guthrie, D., Lamont, A., Jayson, G. C., ... Swart, A. M. (2010). Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. *Lancet*, 376(9747), 1155–63. doi:10.1016/S0140-6736(10)61268-8
- Rustin, G., Quinn, M., Thigpen, T., du Bois, A., Pujade-Lauraine, E., Jakobsen, A., ... Vermorken, J. (2004). Re: New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors (Ovarian Cancer). *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 96(6), 487–488. doi:10.1093/jnci/djh081
- Sabbatini, P., Harter, P., Scambia, G., Sehouli, J., Meier, W., Wimberger, P., ... Pfisterer, J. (2013). Abagovomab as maintenance therapy in patients with epithelial ovarian cancer: a phase III trial of the AGO OVAR, COGI, GINECO, and GEICO--the MIMOSA study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(12), 1554–61. doi:10.1200/JCO.2012.46.4057
- Seidman, J. D., Horkayne-Szakaly, I., Haiba, M., Boice, C. R., Kurman, R. J., & Ronnett, B. M. (2004). The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *International Journal of Gynecological Pathology : Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 23(1), 41–4. doi:10.1097/01.pgp.0000101080.35393.16
- Shen, Y.-A., Wang, C.-Y., Chuang, H.-Y., Hwang, J. J.-J., Chi, W.-H., Shu, C.-H., ... Chen, Y.-J. (2016). CD44 and CD24 coordinate the reprogramming of nasopharyngeal carcinoma cells towards a cancer stem cell phenotype through STAT3 activation. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.11113
- Shield, K., Ackland, M. L., Ahmed, N., & Rice, G. E. (2009). Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecologic Oncology*, 113(1), 143–8. doi:10.1016/j.ygyno.2008.11.032
- Shimizu, A., Hirono, S., Tani, M., Kawai, M., Okada, K.-I., Miyazawa, M., ... Yamaue, H. (2012). Coexpression of MUC16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Science*, 103(4), 739–46. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02214.x
- Shmelkov, S. V., Butler, J. M., Hooper, A. T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., ... Rafii, S. (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2111–20. doi:10.1172/JCI34401
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer Statistics , 2013, 63(1), 11–30. doi:10.3322/caac.21166.
- Silva, I. a, Bai, S., McLean, K., Yang, K., Griffith, K., Thomas, D., ... Buckanovich, R. J. (2011). Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines

- angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Research*, 71(11), 3991–4001. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3175
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., ... Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396–401. doi:10.1038/nature03128
- Skates, S. J., Horick, N., Yu, Y., Xu, F.-J., Berchuck, A., Havrilesky, L. J., ... Bast, R. C. (2004). Preoperative sensitivity and specificity for early-stage ovarian cancer when combining cancer antigen CA-125II, CA 15-3, CA 72-4, and macrophage colony-stimulating factor using mixtures of multivariate normal distributions. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(20), 4059–66. doi:10.1200/JCO.2004.03.091
- Smyth, J. F., Gourley, C., Walker, G., MacKean, M. J., Stevenson, A., Williams, A. R. W., ... Langdon, S. P. (2007). Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(12), 3617–22. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2878
- Soper, J. T., Hunter, V. J., Daly, L., Tanner, M., Creasman, W. T., & Bast, R. C. (1990). Preoperative serum tumor-associated antigen levels in women with pelvic masses. *Obstetrics and Gynecology*, 75(2), 249–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2300353>
- Stirling, D., Porteous, M. E., Evans, D. G., Pichert, G., & Steel, M. (2006). Familial ovarian cancer screening. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(6), e11. doi:10.1200/JCO.2005.04.3356
- Sturgeon, C. M., Duffy, M. J., & Walker, G. (2011). The National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) guidelines for early detection of ovarian cancer: the pivotal role of the clinical laboratory. *Annals of Clinical Biochemistry*, 48(Pt 4), 295–9. doi:10.1258/acb.2011.011117
- Suh-Burgmann, E., & Kinney, W. (2016). The Value of Ultrasound Monitoring of Adnexal Masses for Early Detection of Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 6, 25. doi:10.3389/fonc.2016.00025
- Sutherland, R. M., & Durand, R. E. (1976). Radiation response of multicell spheroids--an in vitro tumour model. *Current Topics in Radiation Research Quarterly*, 11(1), 87–139. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/128440>
- Sutherland, R. M., McCredie, J. A., & Inch, W. R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(1), 113–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5101993>

- Suzuki, S. T. (1996). Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(4), 531–42. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19960616)61:4<531::AID-JCB6>3.0.CO;2-P
- Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S. J., Tanji, Y., Taguchi, T., ... Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(12), 4234–41. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1479
- Tang, Z., Qian, M., & Ho, M. (2013). The role of mesothelin in tumor progression and targeted therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(2), 276–80. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3568227&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Thériault, C., Pinard, M., Comamala, M., Migneault, M., Beaudin, J., Matte, I., ... Rancourt, C. (2011). MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth, tumorigenesis and metastasis. *Gynecologic Oncology*, 121(3), 434–43. doi:10.1016/j.ygyno.2011.02.020
- Trimbos, J. B., Vergote, I., Bolis, G., Vermorken, J. B., Mangioni, C., Madronal, C., ... Pecorelli, S. (2003). Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(2), 113–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529344>
- Trumpp, A., & Wiestler, O. D. (2008). Mechanisms of Disease: cancer stem cells--targeting the evil twin. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 5(6), 337–47. doi:10.1038/ncponc1110
- Tse, B. W. C., Collins, a, Oehler, M. K., Zippelius, a, & Heinzelmann-Schwarz, V. a. (2014). Antibody-based immunotherapy for ovarian cancer: where are we at? *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 25(2), 322–31. doi:10.1093/annonc/mdt405
- Tuxen, M. K., Sölétormos, G., & Dombernowsky, P. (2002). Serum tumor marker CA 125 for monitoring ovarian cancer during follow-up. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 62(3), 177–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088336>
- Uchida, Y., Raina, D., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2013). Inhibition of the MUC1-C oncoprotein is synergistic with cytotoxic agents in the treatment of breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 14(2), 127–34. doi:10.4161/cbt.22634

- Uesato, S., Yamashita, H., Maeda, R., Hirata, Y., Yamamoto, M., Matsue, S., ... Ju-ichi, M. (2014). Synergistic antitumor effect of a combination of paclitaxel and carboplatin with nobiletin from *Citrus depressa* on non-small-cell lung cancer cell lines. *Planta Medica*, 80(6), 452–7. doi:10.1055/s-0034-1368321
- Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K. F., & Nebert, D. W. (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics*, 9(4), 421–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10780262>
- Vergote, I., du Bois, A., Amant, F., Heitz, F., Leunen, K., & Harter, P. (2013). Neoadjuvant chemotherapy in advanced ovarian cancer: On what do we agree and disagree? *Gynecologic Oncology*, 128(1), 6–11. doi:10.1016/j.ygyno.2012.09.013
- Vergote, I., Leunen, K., & Amant, F. (2012a). Gynecologic Oncology Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy in ovarian cancer : What is the value of comparing apples with oranges ? *Gynecologic Oncology*, 124(1), 1–2. doi:10.1016/j.ygyno.2011.11.010
- Vergote, I., Leunen, K., & Amant, F. (2012b). Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy in ovarian cancer: what is the value of comparing apples with oranges? *Gynecologic Oncology*, 124(1), 1–2. doi:10.1016/j.ygyno.2011.11.010
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314–22. doi:10.1038/nature09781
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews. Cancer*, 8(10), 755–68. doi:10.1038/nrc2499
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 10(6), 717–28. doi:10.1016/j.stem.2012.05.007
- Wang, J., Sakariassen, P. Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S. O., Svendsen, A., ... Enger, P. Ø. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International Journal of Cancer*, 122(4), 761–8. doi:10.1002/ijc.23130
- Wang, L., Mezencev, R., Bowen, N. J., Matyunina, L. V., & McDonald, J. F. (2012). Isolation and characterization of stem-like cells from a human ovarian cancer cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 363(1-2), 257–68. doi:10.1007/s11010-011-1178-6
- Wang, Y.-C., Yo, Y.-T., Lee, H.-Y., Liao, Y.-P., Chao, T.-K., Su, P.-H., & Lai, H.-C. (2012). ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44 expression, drug resistance, and poor clinical outcome. *The American Journal of Pathology*, 180(3), 1159–69. doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.015

- Wang, Z., Wang, Q., Wang, Q., Wang, Y., & Chen, J. (2016). Prognostic significance of CD24 and CD44 in breast cancer: a meta-analysis. *The International Journal of Biological Markers*. doi:10.5301/jbm.5000224
- Weaver, V. M., Lelièvre, S., Lakins, J. N., Chrenek, M. A., Jones, J. C. R., Giancotti, F., ... Bissell, M. J. (2002). beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, 2(3), 205–16. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2788997&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wilder, J. L., Pavlik, E., Straughn, J. M., Kirby, T., Higgins, R. V, DePriest, P. D., ... Nagell, J. van. (2003). Clinical implications of a rising serum CA-125 within the normal range in patients with epithelial ovarian cancer: a preliminary investigation. *Gynecologic Oncology*, 89(2), 233–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713985>
- Yin, B. W., & Lloyd, K. O. (2001). Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27371–5. doi:10.1074/jbc.M103554200
- Yin, B. W. T., Dnistrian, A., & Lloyd, K. O. (2002). Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 98(5), 737–40. doi:10.1002/ijc.10250
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M. W., Lai, H.-C., Matei, D., Schilder, J. M., ... Nephew, K. P. (2008). Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. *Cancer Research*, 68(11), 4311–4320. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0364

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: REDUKTION DER OBERFLÄCHLICHEN CA125 PROTEINEXPRESSION IN STABILEN OAWH8 ⁺ KNOCKDOWN ZELLEN. DARSTELLUNG DES ANTEILS DER ZELLEN MIT CA125 EXPRESSION ABZÜGLICH DER UNSPEZIFISCHEN FÄRBUNG DER ISOTYPKONTROLLE AN ALLEN VITALEN ZELLEN. * $p < 0,05$	47
ABBILDUNG 2: REDUKTION DER OBERFLÄCHLICHEN CA125 PROTEINEXPRESSION IN STABILEN OAWB8 ⁻ KNOCKDOWN ZELLEN. DARSTELLUNG DES ANTEILS DER ZELLEN MIT CA125 EXPRESSION ABZÜGLICH DER UNSPEZIFISCHEN FÄRBUNG DER ISOTYPKONTROLLE AN ALLEN VITALEN ZELLEN. * $p < 0,05$	47
ABBILDUNG 3: OBERFLÄCHLICHE EXPRESSION DER TUMORSTAMMZELLMARKER CD24, CD44, CD133 UND CD117 IM VERGLEICH ZWISCHEN CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN UND DER CA125 ⁺ KONTROLLE IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ . * $p < 0,05$	48
ABBILDUNG 4: OBERFLÄCHLICHE EXPRESSION DER TUMORSTAMMZELLMARKER CD24, CD44 UND CD133 IM VERGLEICH ZWISCHEN CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN UND DER CA125 ⁺ KONTROLLE IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE. * $p < 0,035$	49
ABBILDUNG 5: MESSUNG DER ALDH AKTIVITÄT IM VERGLEICH VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN UND CA125 ⁺ KONTROLLE IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE * $p < 0,02$	51
ABBILDUNG 6: MESSUNG DER ALDH AKTIVITÄT IM VERGLEICH VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN UND CA125 ⁺ KONTROLLE IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE.	52
ABBILDUNG 7: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN IM VERGLEICH ZU CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE NACH MONOLAYERKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER CARBOPLATINKONZENTRATIONEN.	54
ABBILDUNG 8: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN IM VERGLEICH ZU CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE NACH MONOLAYERKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER PACLITAXELKONZENTRATIONEN.	55
ABBILDUNG 9: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN IM VERGLEICH ZU CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE NACH MONOLAYERKULTUR UNTER VERWENDUNG EINER FESTEN CARBOPLATINKONZENTRATION (19µm) UND UNTERSCHIEDLICHEN PACLITAXELKONZENTRATIONEN.	56
ABBILDUNG 10: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN IM VERGLEICH ZU CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ . DIE CHEMOSENSITIVITÄT ERFOLGTE NACH MONOLAYERKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER CARBOPLATINKONZENTRATIONEN.	57
ABBILDUNG 11: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN IM VERGLEICH ZU CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ . DIE	

CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE NACH MONOLAYERKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER PACLITAXELKONZENTRATIONEN.....	58
ABBILDUNG 12: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN IM VERGLEICH ZU CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE NACH MONOLAYERKULTUR UNTER VERWENDUNG EINER FESTEN CARBOPLATINKONZENTRATION (25 µM) UND UNTERSCHIEDLICHEN PACLITAXELKONZENTRATIONEN.	59
ABBILDUNG 13: OAWB8 ⁻ NC ZELLEN NACH 2 TAGEN (A) UND NACH 4 TAGEN (B) AUF SUSPENSIONSPLATTE IN SPHÄROIDMEDIUM.....	62
ABBILDUNG 14: OAWB8 ⁻ NC ZELLEN NACH 2 TAGEN (A) UND NACH 4 TAGEN (B) AUF SUSPENSIONSPLATTE IN RPMI- MEDIUM.....	62
ABBILDUNG 15: OAWB8 ⁻ CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN NACH 2 TAGEN (A) UND NACH 4 TAGEN (B) AUF SUSPENSIONSPLATTE IN SPHÄROIDMEDIUM.	63
ABBILDUNG 16: OAWB8 ⁻ CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN NACH 2 TAGEN (A) UND NACH 4 TAGEN (B) AUF SUSPENSIONSPLATTE IN RPMI-MEDIUM.....	63
ABBILDUNG 17: OAWB8 ⁻ NC ZELLEN NACH 2 TAGEN (A) UND NACH 6 TAGEN (B) AUF LOW-ATTACHMENT- PLATTE IN SPHÄROIDMEDIUM.	65
ABBILDUNG 18: OAWB8 ⁻ CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN NACH 2 TAGEN (A) UND NACH 6 TAGEN (B) AUF LOW- ATTACHMENT-PLATTE IN SPHÄROIDMEDIUM.....	65
ABBILDUNG 19: (A) OAWH8 ⁺ NC ZELLEN NACH 6 TAGEN UND (B) OAWH8 ⁺ CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN NACH 6 TAGEN AUF AGAROSE-PETRISCHALE IN SPHÄROIDMEDIUM.....	66
ABBILDUNG 20: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN NACH MONOLAYERKULTUR UND NACH SPHÄROIDKULTUR IM VERGLEICH MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE SOWOHL IN MONO- ALS AUCH IN SPHÄROIDKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER CARBOPLATINKONZENTRATIONEN.	68
ABBILDUNG 21: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN NACH MONOLAYERKULTUR UND NACH SPHÄROIDKULTUR IM VERGLEICH MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE SOWOHL IN MONOLAYER- ALS AUCH IN SPHÄROIDKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER PACLITAXELKONZENTRATIONEN.	69
ABBILDUNG 22: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN NACH MONOLAYERKULTUR UND NACH SPHÄROIDKULTUR IM VERGLEICH MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE SOWOHL IN MONOLAYER- ALS AUCH IN SPHÄROIDKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER CARBOPLATINKONZENTRATIONEN.....	70
ABBILDUNG 23: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN NACH MONOLAYERKULTUR UND NACH SPHÄROIDKULTUR IM VERGLEICH MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE SOWOHL IN MONOLAYER- ALS AUCH IN SPHÄROIDKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER CARBOPLATINKONZENTRATIONEN.....	70
ABBILDUNG 24: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN IN MONOLAYERKULTUR UND NACH SPHÄROIDKULTUR IM VERGLEICH MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ . DIE	

CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE SOWOHL IN MONOLAYER- ALS AUCH IN SPHÄROIDKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER PACLITAXELKONZENTRATIONEN.....	71
ABBILDUNG 25: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN NACH MONOLAYERKULTUR UND NACH SPHÄROIDKULTUR IM VERGLEICH MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE SOWOHL IN DER MONOLAYER- ALS AUCH IN DER SPHÄROIDKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER PACLITAXELKONZENTRATIONEN.....	72
ABBILDUNG 26: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN IM VERGLEICH ZU CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE NACH SPHÄROIDKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER CARBOPLATINKONZENTRATIONEN.	74
ABBILDUNG 27: BESTIMMUNG DER CHEMOSENSITIVITÄT VON CA125 ⁻ KNOCKDOWNZELLEN IM VERGLEICH ZU CA125 ⁺ KONTROLLZELLEN MITTELS MTT IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ . DIE CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ERFOLGTE NACH SPHÄROIDKULTUR UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER PACLITAXELKONZENTRATIONEN.	75

8.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: FIGO-STADIEN UND TNM-KLASSIFIKATION DES OVARIALKARZINOMS NACH J. PRAT (PRAT, 2014). ...	4
TABELLE 2: ÜBERBLICK ÜBER DIE KLONE DER ZELLINIEN OAWB8 ⁻ UND OAWH8 ⁺ UND DEREN CA125 EXPRESSION	34
TABELLE 3: ÜBERBLICK DER EXPRESSION DER TUMORSTAMMZELLMARKER CD24, CD44, CD113 UND CD117 IN DEN ZELLINIEN OAWB8 ⁻ UND OAWH8 ⁺	50
TABELLE 4: ÜBERBLICK DER ALDH-EXPRESSION IN DEN ZELLINIEN OAWB8 ⁻ UND OAWH8 ⁺	53
TABELLE 5: ÜBERBLICK DER IC ₅₀ -WERTE IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ NACH BEHANDLUNG MIT CARBOPLATIN, PACLITAXEL UND KOMBINATIONSTHERAPIE.....	60
TABELLE 6: : ÜBERBLICK DER IC ₅₀ -WERTE IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ NACH BEHANDLUNG MIT CARBOPLATIN, PACLITAXEL UND KOMBINATIONSTHERAPIE.....	61
TABELLE 7: : ÜBERBLICK DER IC ₅₀ -WERTE IN DER ZELLINIE OAWB8 ⁻ NACH BEHANDLUNG MIT CARBOPLATIN, PACLITAXEL UND KOMBINATIONSTHERAPIE IN MONOLAYER- UND SPHÄROIDKULTUR.....	73
TABELLE 8: ÜBERBLICK DER IC ₅₀ -WERTE IN DER ZELLINIE OAWH8 ⁺ NACH BEHANDLUNG MIT CARBOPLATIN, PACLITAXEL UND KOMBINATIONSTHERAPIE IN MONOLAYER- UND SPHÄROIDKULTUR.....	73

8.3 Abkürzungsverzeichnis

ALDH	Aldehyd Dehydrogenase
BMI	Body Mass Index
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2
dsRNA	double-stranded Ribonucleic acid
CAM	Cell Adhesion Molecule
CA125	Cancer Antigen 125
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
CT	Computertomographie
ECACC	European Collection of Cell Culture
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Estrogen Receptor
ErbB2	Her2 Erythroblastosis Oncogene B, Human Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FSC	Forward Scatter
GCIG	Gynecological Cancer InterGroup
HE4	Human epididymis protein 4
HGSC	High Grade Serous Carcinoma
IC ₅₀	half maximal Inhibitory Concentration
IFN	Interféron
IL	Interleukin
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MUC16	Mucin 16
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
PARP	Poly(ADP)Ribose Polymerasen
PCR	Polymerase Chain Reaction
RISC	RNA-Induced-Silencing-Complex
RNAi	Ribonucleic acid Interferenz
scFv	single chain variable Fragment
shRNA	short hairpin Ribonucleic acid

siRNA	short interfering Ribonucleic acid
SSC	Side Scatter
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
TR	Tandem Repeat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Albert, Bachmann, Barth, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Cetin, Daut, Fendrich, Feuser, Gress, Geks, Hegele, Hertl, Hofmann, Höffken, Hoyer, Jerrentrup, Kalder, Kann, Kinscherf, Kircher, Klose, Koehler, König, Kohlmann, Kruse, Kühnert, Lill, Lohoff, Maier, Meissner, Moll, Möller, Moosdorf, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Neumüller, Neubauer, Oertl, Olbert, Opitz, Oliver, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Pryss, Renz, Richter, Ruchholz, Schäfer, Schmidt, Schmied, Schütz, Sekundo, Seitz, Steiniger, Tackenberg, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Zwioerek

8.6 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wagner danke ich zum einen für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und zum anderen für die Begeisterung für das Fach Gynäkologie, die sich bei mir maßgeblich aufgrund seiner Lehre im Rahmen meines Studiums entwickelte.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Betreuerin Sophie Kage, die mir während dem experimentellen Teil dieser Arbeit mit Rat und Tat sowie mit ihrer netten und motivierenden Art zur Seite stand und die mich auch bei der Auswertung der Daten unterstützte.

Ebenso danke ich Frau Dr. Reinartz für ihre ausgezeichnete Betreuung und die Möglichkeit dieses Thema in ihrer Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen. Des Weiteren bedanke ich mich bei Traute Plaum und Achim Allmeroth für die Bereitschaft mir in technischen Fragen zur Seite zu stehen.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie für die Unterstützung nicht nur während dieser Arbeit, sondern auch während meines gesamten Studiums bedanken. Ich danke ihnen für ihre stete Motivation und das Vertrauen in mich und meine Arbeit.